

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-300906
(P2003-300906A)

(43)公開日 平成15年10月21日(2003.10.21)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
A 6 1 K 45/00	Z N A	A 6 1 K 45/00	Z N A 2 G 0 4 5
38/55		A 6 1 P 35/04	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/04		43/00	1 1 1 4 B 0 6 3
43/00	1 1 1	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/47		C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 33 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002-110670(P2002-110670)

(22)出願日 平成14年4月12日(2002.4.12)

(71)出願人 390010205

第一ファインケミカル株式会社
富山県高岡市長慶寺530番地

(72)発明者 佐藤 博

石川県金沢市平和町3丁目18番15号 平和
宿舎C57-11

(72)発明者 青木 隆則

富山県高岡市長慶寺530番地 第一ファイ
ンケミカル株式会社内

(74)代理人 100097582

弁理士 水野 昭宣

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がん転移抑制因子の安定化

(57)【要約】

【課題】 ヒトがん転移抑制遺伝子として同定されたKiSS-1に関連したメタスチンあるいはメタスチン(45-54)が有する癌転移抑制活性がどの様に制御されているのか、特にどの様にして不活性化されるかを解明し、もって癌細胞・癌組織に作用せしめて効率良く癌転移抑制を達成することが求められている。

【解決手段】 MMPsが、KiSS-1タンパク質であるメタスチンの118位グリシンと119位ロイシン間を切断すること、この切断によってメタスチンの転移抑制機能が不活性化されること、MMP阻害剤によるメタスチンの安定化、MMP阻害剤で安定化したメタスチンによる癌転移抑制、MMPsのメタスチン切断部位に変異を導入したMMPs耐性メタスチンなどを提供でき、さらにMMPs耐性メタスチンによる癌転移抑制が可能となった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものに対するMMPsによる切断を阻害するものであることを特徴とする切断阻害剤。

【請求項2】切断阻害剤がMMP阻害剤であることを特徴とする請求項1記載の阻害剤。

【請求項3】(1) MMP阻害剤及び(2) (i) がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものを含有していることを特徴とするKiSS-1産物及びメタスチン並びにその誘導体の安定化組成物。

【請求項4】(i) がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものをMMP阻害剤により安定化することを特徴とするKiSS-1産物並びにメタスチン及びその誘導体の安定化法。

【請求項5】(1) MMP阻害剤及び(2) (i) がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものを含有しており、がん転移抑制活性を有することを特徴とする安定化がん転移抑制剤。

【請求項6】(i) がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものをMMP阻害剤により安定化することを特徴とするがん転移抑制剤の安定化法。

【請求項7】がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものであるが、MMPsから成る群から選ばれたものの切断に対して抵抗性が付与されているかあるいはMMPsから成る群から選ばれたものの切断部位に変異を導入したものを有することを特徴とする変異KiSS-1タンパク質並びに変異メタスチン及びその誘導体。

【請求項8】配列番号:1のGly¹¹⁸-Leu¹¹⁹の間でのMMPの切断に対して抵抗性であるかあるいは該切断部位Gly¹¹⁸-Leu¹¹⁹に変異を有していることを特徴とする請求項7記載の変異KiSS-1タンパク質並びに変異メタスチン及びその誘導体。

【請求項9】請求項7又は8記載の変異KiSS-1タンパク質並びに変異メタスチン及びその誘導体から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする医薬。

【請求項10】がん転移抑制のためのものであることを特徴とする請求項9記載の医薬。

【請求項11】(1) MMPsから成る群から選ばれたもの及び(2) がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、

メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものに対するレセプターとの共存下に、試験試料を、転移性細胞と接触せしめることを特徴とするがん転移抑制剤のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、がん転移抑制因子の安定化技術に関する。本発明は、安定化されたがん転移抑制因子を使用するがんの浸潤・転移の阻害などに関する医薬や治療法を提供する。

【0002】

【従来の技術】マトリックスメタロプロテアーゼ類(matrix metalloproteinases: MMPs)は、一群のZn²⁺依存性の酵素で、細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)タンパク質を生理的あるいは病理的な状態下で切断する。これまでに、数多くの哺乳類MMPsがcDNAクローニングによりアミノ酸レベルまで解析されている。例えば、MMP-1 (collagenase); MMP-2 (gelatinase A); MMP-3 (stromelysin-1); MMP-7 (matrilysin); MMP-8 (neutrophil collagenase); MMP-9 (gelatinase B); MMP-10 (stromelysin-2); MMP-11 (stromelysin-3); MMP-12 (macrophage elastase); MMP-13 (collagenase-3); MMP-14 (MT1-MMP); MMP-15 (MT2-MMP); MMP-16 (MT3-MMP); MMP-17 (MT4-MMP); MMP-19; MMP-20 (enamelysin); MMP-24 (MT5-MMP); MMP-25 (MT6-MMP)などである。MMPは、種々の悪性腫瘍で過剰発現し、ECM成分を分解することにより腫瘍の浸潤・転移に貢献する。それゆえ、MMPの発現レベルは、腫瘍の浸潤能あるいは悪性度と相関する。最近の研究によると、MMPはECM構成成分だけではなく、細胞表面のリセプターやリガンドのような非マトリックスタンパク質も切断することが示してきた。

【0003】ヒトがん転移抑制遺伝子として同定されたKiSS-1は、ヒトメラノーマや乳癌の転移を抑制する。KiSS-1遺伝子の発現により、ヒト悪性黒色細胞腫細胞やヒト乳癌細胞の転移が抑制されていることが知られているが、その抑制作用のメカニズム等は不明であった。KiSS-1のC-末端に位置する68位のグリシンから121位のフェニルアラニンの、54個のアミノ酸残基からなるアミド化ペプチドが、ヒト胎盤からGタンパク質共役型オーファン受容体(hOT7T175)の内因性リガンドとして単離され、これらがhOT7T175を導入したB16-BL6細胞の転移を抑制したことから「メタスチン(melastatin)」と命名された(Nature, 411: 613 (2001))。メタスチンのC-末端側ペプチドであるメタスチン(45-54)は、メタスチンのおよそ10倍の癌転移抑制活性を示した。このメタスチン(45-54)は、KiSS-1(112-121) (J. Biol. Chem., 276, 28969-28969 (2001))、あるいはKisspeptin-10 (J. Biol. Chem., 276, 34631-34636 (2001))とも呼ばれている。

【0004】メタスチンあるいはメタスチン(45-54)の

代謝に関する報告はなく、メタスチンあるいはメタスチ
ン(45-54)の有するがん転移抑制活性の維持に関する知
見もない。癌細胞・癌組織においては、MMPが過剰発現
していることが知られているが、タンパク質レベルでの
MMPとメタスチンあるいはメタスチ(45-54)の関連を示
す報告はなく、遺伝子レベルでKiSS-1がMMP-9の発現を
抑制するとの報告があるのみである(J. Biol. Chem., 2
76, 34631-34636 (2001))。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】癌細胞・癌組織では、
多様なプロテアーゼが発現していることが知られている。
特に、MMPsは、多くの癌細胞・癌組織で過剰発現し、
腫瘍の浸潤能あるいは悪性度と相関する重要な
プロテアーゼ群である。メタスチンあるいはメタスチ
ン(45-54)が、その癌転移抑制活性を発揮するためには、
作用する癌細胞・癌組織の近傍に安定して到達、作用す
ることが必要であるが、この過程におけるMMPの関与は
明らかでなかった。メタスチンあるいはメタスチ(45-
54)の癌転移抑制活性を保持し、癌細胞・癌組織に作用
させることは、癌転移抑制を効率良く達成するために重
要な課題である。

【0006】

【課題を解決するための手段】発現クローニング法は、
MT1-MMPを介したプロMMP-2の活性化に関する遺伝子の
検索だけではなく、プロMMP-2あるいはプロMMP-9に相互
作用する遺伝子のスクリーニングにも有効である。本發
明者らは、発現クローニング法を用いた研究の結果、Ki
SS-1遺伝子産物がMMPsと安定な複合体を形成することを
見出すことに成功した。さらに活性型MMPsが、KiSS-1タ
ンパク質の118位グリシンと119位ロイシン間を切断する
こと、この切断によってメタスチンの転移抑制機能が不
活性化されることを明らかにすることに成功した。これら
の知見に基づき、MMP阻害剤(MMP inhibitors: MMPI
s)の新規な用途、MMP阻害剤によるメタスチンの安定
化、MMP阻害剤で安定化したメタスチンによる癌転移抑
制、MMPsのメタスチン切断部位に変異を導入したMMPs耐
性メタスチン、さらにMMPs耐性メタスチンによる癌転
移抑制に関する発明を完成させた。

【0007】本発明は、

〔1〕がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、
メタスチ(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸
配列を含有するものに対するMMPsによる切断を阻害す
るものであることを特徴とする切断阻害剤；
〔2〕切断阻害剤がMMP阻害剤であることを特徴とす
る上記〔1〕記載の阻害剤；
〔3〕(1) MMP阻害剤及び(2)(i)がん転移抑制遺傳
子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチ(45-54)及びそ
れと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成
る群から選ばれたものとを含有していることを特徴とす
るKiSS-1産物及びメタスチン並びにその誘導体の安定化

組成物；

- 〔4〕(i)がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチ
ン、メタスチ(45-54)及びそれと実質的に同一のアミ
ノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものを
MMP阻害剤により安定化することを特徴とするKiSS-1産
物並びにメタスチン及びその誘導体の安定化法；
〔5〕(1) MMP阻害剤及び(2)(i)がん転移抑制遺傳
子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチ(45-54)及びそ
れと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成
る群から選ばれたものとを含有しており、がん転移抑制
活性を有することを特徴とする安定化がん転移抑制剤；
〔6〕(i)がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチ
ン、メタスチ(45-54)及びそれと実質的に同一のアミ
ノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものを
MMP阻害剤により安定化することを特徴とするがん転
移抑制剤の安定化法；
〔7〕がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、
メタスチ(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸
配列を含有するものから成る群から選ばれたものである
が、MMPsから成る群から選ばれたものの切断に対して抵
抗性が付与されているかあるいはMMPsから成る群から選
ばれたものの切断部位に変異を導入したことであることを
特徴とする変異KiSS-1タンパク質並びに変異メタスチ
ン及びその誘導体；
〔8〕配列番号:1のGly¹¹⁸-Leu¹¹⁹の間
でのMMPの切断に対して抵抗性であるかあるいは該切断
部位Gly¹¹⁸-Leu¹¹⁹に変異を有していることを特徴とす
る上記〔7〕記載の変異KiSS-1タンパク質並びに変異メ
タスチン及びその誘導体；
〔9〕上記〔7〕又は〔8〕記載の変異KiSS-1タンパ
ク質並びに変異メタスチン及びその誘導体から成る群か
ら選ばれたものを有効成分として含有することを特徴と
する医薬；
〔10〕がん転移抑制のためのものであることを特徴と
する上記〔9〕記載の医薬；及び
〔11〕(1)MMPsから成る群から選ばれたもの及び(2)
がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチ
ン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含
有するものから成る群から選ばれたものに対するレセプ
ターとの共存下に、試験試料を、転移性細胞と接触せし
めることを特徴とするがん転移抑制剤のスクリーニング
方法並びにそのための試薬；
〔12〕(1)MMPsから成る群から選ばれたもの及び(2)
がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチ
ン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含
有するものから成る群から選ばれたものに対するレセプ
ターとを共発現する細胞に、試験試料を接触せしめること
を特徴とする上記〔11〕記載のがん転移抑制剤のス
クリーニング方法並びにそのための試薬；及び
〔13〕MMP阻害剤が、W0, A, 00/03703, W0, A, 00/03

734, WO, A, 01/092507及びそこに引用した文献に開示のものから成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔2〕記載の阻害剤を提供している。

【0009】本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明で、(1) ヒト癌転移抑制遺伝子KiSS-1産物は、MMP と相互作用して切断され、その活性を失うこと、(2) 例えばMT3-MMP はKiSS-1タンパク質をそのC末端のLRF 配列の前で切断すること、さらには(3) 該LRF 配列の前のアミノ酸残基（例えば、グリシン）を、別のアミノ酸残基（例えば、ロイシンなど）に置換した変異KiSS-1タンパク質（KiSS-1タンパク質変異体）は、MT3-MMP による切断に対して抵抗性のものであること、(4) メタスチン(metastin)レセプターを発現している細胞では、メタスチンで処理することにより、細胞運動の低下をまねくアクチントレスファイバーとフォーカルアドヒージョン(focal adhesion)形成が起こるが、一方metastinレセプター及びMT1-MMP を発現させた細胞では、メタスチンの効果がなくなることが見出された。こうした知見を利用する技術はすべて本発明の思想の範囲内である。

【0011】本発明で、潜在型MMP-9 とKiSS-1タンパク質との複合体が、110 kDa のゼラチン分解活性に寄与していること、KiSS-1タンパク質は潜在型MMP-2 とも複合体を形成するが、一方活性型MMP-2 とはしていないこと、KiSS-1タンパク質のCys⁵³とMMP に存在するPRCGVPD 配列中のCys 残基がS-S 結合をすることが示唆されていること、MMP の作用によりKiSS-1タンパク質はGly¹¹⁸-Leu¹¹⁹ の間で切断されること、さらにKiSS-1タンパク質の68-121の54個のアミノ酸からなるC末端がアミド化されたペプチド（G蛋白質共役型レセプター(G protein-coupled receptor) hOT7T175 のリガンドとして同定されていることが報告されている）であるメタスチンのC末端の10個のアミノ酸からなるメタスチン(45-54) (metastin (45-54)) はさらに強力なリガンドと報告されているが、そのペプチドもMMP の作用により効率良く分解されること、これらのことからMMP による癌転移抑制因子KiSS-1/metastin 分解活性は、転移に促進的に働くと推

測されること、さらに癌転移抑制因子KiSS-1/metastin を安定化せしめる手法が開発できること、MMP阻害剤を使用すれば癌転移抑制因子KiSS-1/metastin を安定化可能であること、安定性に優れたKiSS-1/metastin 変異体やKiSS-1/metastin 誘導体を開発でき、様々な医薬用途などその生物活性などを利用した応用ができるなどを認識している。したがって、こうした知見を利用する技術もすべて本発明の思想の範囲内である。本発明で言及するメタスチン、メタスチン(45-54)、G蛋白質共役型レセプター hOT7T175 については、例えば Nature, 411: 613 (2001); J. Biol. Chem., 276: 28969 (2001); 特開平2000-312590 号公報; 特開平2001-340094 号公報などを参照することができ、それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる。

【0012】本発明では、「遺伝子組換え技術」を利用して所定の核酸を単離・配列決定したり、組換え体を作製したり、所定のペプチドを得ることができる。本明細書中使用できる遺伝子組換え技術としては、当該分野で知られたものが挙げられ、例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、東京化学同人 (1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III（組換えDNA 技術）」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法が挙げられる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

【0013】本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、以下に記載するような如何なるポリペプチドを指すものであってもよい。ポリペプチドの基本的な構造は周知であり、当該技術分野において非常に数多くの参考書及びその他の刊行物に記載がある。こうしたことによると、本明細書で用いる用語「ポリペプチド」は、ペプ

チド結合又は修飾したペプチド結合により互いに結合しているような2個又はそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又は任意のタンパク質を意味する。本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、当該分野において、例えばペプチド、オリゴペプチドあるいはペプチドオリゴマーとも称せられる短い鎖のもの、及びタンパク質と一般的に言われ、多くの形態のものが知られている長い鎖のものの両方を通常意味してよい。ポリペプチドは、しばしば、通常、天然型アミノ酸（天然に存在しているアミノ酸：あるいは遺伝子でコードされるアミノ酸）と称されるアミノ酸以外のアミノ酸を含有していてもよい。ポリペプチドは、また末端アミノ酸残基を含めて、その多くのアミノ酸残基が翻訳された後にプロセッシング及びその他の改変（あるいは修飾）されるといった天然の工程によるのみならず、当業者に周知の化学的改変技術によっても、上記のポリペプチドはそれが改変（修飾）できることは理解されよう。該ポリペプチドに加えられる改変（修飾）については、多くの形態のものが知られており、それらは当該分野の基礎的な参考書及びさらに詳細な論文並びに多数の研究文献にも詳しく記載されており、これらは当業者に周知である。幾つかのとりわけ常套的な改変・修飾としては、例えばアルキル化、アシル化、エステル化、アミド化、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、リン酸化、グルタミン酸残基のアーカルボキシル化、水酸化及びADP-リボシル化等が挙げられ、例えばT. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, Second Edition, W. H. Freeman and Company, New York, (1993); B.C. Johnson (Ed.), *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, Academic Press, New York, (1983) (Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects", pp.1-12); Seifter et al., "Analysis for Protein Modifications and nonprotein cofactors", *Methods in Enzymology*, 182: 626-646 (1990); Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modification and Aging", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 663: p.48-62 (1992)等の記載を参照できる。

【0014】本明細書中、「相同性」とは、ポリペプチド配列（あるいはアミノ酸配列）又はポリヌクレオチド配列（あるいは塩基配列）における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出できる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」（「同一性」とも言われる）なる用語は、当業者には周知である（例えば、Lesk, A. M. (Ed.), *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New Y

ork, (1988); Smith, D. W. (Ed.), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Grifin, A. M. & Grifin, H. G. (Ed.), *Computer Analysis of Sequence Data: Part I, Human* Press, New Jersey, (1994); von Heijne, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), *Sequence Analysis Primer*, M-Stockton Press, New York, (1991) 等）。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), *Guide to Huge Computers*, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. & Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988) 等に開示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コンピュータープログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二つの配列間の相同性を測定するための好ましいコンピュータープログラム法としては、GCG プログラムパッケージ (Devereux, J. et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403 (1990)) 等が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、当該分野で公知の方法を使用することができるし、市販のものを使用できる。本明細書で「高い相同性」といった場合当該対象配列の長さにもよるが、例えば 50% 以上、さらには 60% 以上、好ましくは 70% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、そして特定の場合には 95% 以上で、特に好ましくは 90% 以上であってよい。

【0015】本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Vol. 28, p. 716-734 (1989) に記載されているような既知の方法、例えば、フォスフォトリエステル法、フォスフォジエステル法、フォスファイト法、フォスフォアミダイト法、フォスフォネット法などの方法により化学合成ができる。通常合成は、修飾された固体支持体上で合成を便利に行うことができる事が知られており、例えば、市販されている自動化された合成装置、例えば、model 381A DNA synthesizer (Applied Biosystems)などを用いて行うことができる。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有していてよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有していてよいし、場合によっては、マーカーの付された塩基を含有していてよい。

【0016】本明細書中、「ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(polymerase chain reaction)」又は「PC

R」とは、一般的に、米国特許第4,683,195号明細書などに記載されたような方法を指し、例えば、所望のヌクレオチド配列をインビトロで酵素的に増幅するための方法を指している。一般に、PCR法は、錆型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる2個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うようなサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR法で用いられるプライマーは、錆型内部の増幅されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべきヌクレオチド配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべきヌクレオチド配列に隣接しているものを好ましく使用することができる。5'端側のプライマーとしては、少なくとも開始コドンを含有するか、あるいは該開始コドンを含めて増幅できるように選択し、また3'端側のプライマーとしては、少なくともストップコドンを含有するか、あるいは該ストップコドンを含めて増幅できるように選択することができる。プライマーは、好ましくは5個以上の塩基、さらに好ましくは10個以上の塩基からなるオリゴヌクレオチド、より好ましくは18~25個の塩基からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えばR. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487, 1988; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Froehman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

【0017】PCR反応は、代表的な場合には、例えば錆型（例えば、mRNAを錆型にして合成されたDNA; 1st strand DNA）と該遺伝子に基づいてデザインされたプライマーとを、10×反応緩衝液（Taq DNAポリメラーゼに添付されている）、dNTPs（デオキシヌクレオシド三リン酸dATP, dGTP, dCTP, dTTPの混合物）、Taq DNAポリメラーゼ及び脱イオン蒸留水と混合する。混合物を、例えば、GeneAmp 2400 PCR system, Perkin-Elmer/Cetusなどの自動サーマルサイクラーを用いて一般的なPCRサイクル条件下にそのサイクルを25~60回繰り返すが、増幅

のためのサイクル数は適宜目的に応じて適当な回数とすることができる。PCRサイクル条件としては、例えば、変性90~95°C 5~100秒、アニーリング40~60°C 5~150秒、伸長65~75°C 30~300秒のサイクル、好ましくは変性94°C 15秒、アニーリング58°C 15秒、伸長72°C 45秒のサイクルが挙げられるが、アニーリングの反応温度及び時間は適宜実験によって適当な値を選択できるし、変性反応及び伸長反応の時間も、予想されるPCR産物の鎖長に応じて適当な値を選択できる。アニーリングの反応温度は、通常プライマーと錆型DNAとのハイブリッドのT_m値に応じて変えることが好ましい。伸長反応の時間は、通常1000bpの鎖長当たり1分程度がおよそその目安であるが、より短い時間を選択することも場合により可能である。

【0018】所定の核酸を同定したりするには、ハイブリダイゼーション技術を利用することができる。該ハイブリダイゼーションは、上記「遺伝子組換え技術」を開示する文献記載の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーションは、DNAなどの核酸を含有しているサンプルをナイロンフィルターなどの膜を含めた担体に転写せしめ、必要に応じ変成処理、固定化処理、洗浄処理などを施した後、その担体（例えば、膜など）に転写せしめられたものを、必要に応じ変成させた標識プローブDNA断片と、ハイブリダイゼーション用バッファ中で反応させて行われる。ハイブリダイゼーション処理は、普通約35°C~約80°C、より好適には約50°C~約65°Cで、約15分~約36時間、より好適には約1時間~約24時間行われるが、適宜最適な条件を選択して行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーション処理は、約55°Cで約18時間行われる。ハイブリダイゼーション用バッファとしては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、Rapid hybridization buffer (Amersham)などを用いることができる。転写した担体（例えば、膜など）の変成処理としては、アルカリ変性液を使用する方法が挙げられ、その処理後中和液や緩衝液で処理するのが好ましい。また担体（例えば、膜など）の固定化処理としては、普通約40°C~約100°C、より好適には約70°C~約90°Cで、約15分~約24時間、より好適には約1時間~約4時間ベーキングすることにより行われるが、適宜好ましい条件を選択して行うことができる。例えば、フィルターなどの担体を約80°Cで約2時間ベーキングすることにより固定化が行われる。転写した担体（例えば、膜など）の洗浄処理としては、当該分野で普通に使用される洗浄液、例えば1M NaCl、1mM EDTAおよび0.1% Sodium Dodecyl sulfate (SDS)含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0などで洗うことにより行うことができる。ナイロンフィルターなどの膜を含めた担体としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、ナイロンフィルター

11

[ハイボンド(Hybrid)-N、Amersham]などを挙げることができる。

【0019】上記アルカリ変性液、中和液、緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、アルカリ変性液としては、例えば、0.5MNaOH および1.5M NaCl を含有する液などを挙げることができ、中和液としては、例えば、1.5M NaCl 含有 0.5M Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 などを挙げることができ、緩衝液としては、例えば、2×SSPE (0.36M NaCl、20mM Na₂PO₄ および2mM EDTA) などを挙げができる。またハイブリダイゼーション処理に先立ち、非特異的なハイブリダイゼーション反応を防ぐために、必要に応じて転写した担体(例えば、膜など)はプレハイブリダイゼーション処理することが好ましい。このプレハイブリダイゼーション処理は、例えば、プレハイブリダイゼーション溶液[50% formamide、5×Denhardt's溶液(0.2 %ウシ血清アルブミン、0.2 % polyvinyl pyrrolidone)、5×SSPE、0.1 % SDS、100 μg/ml 热変性サケ精子DNA]などに浸し、約35°C～約50°C、好ましくは約42°Cで、約4～約24時間、好ましくは約6～約8時間反応させることにより行うことができるが、こうした条件は当業者であれば適宜実験を繰り返し、より好ましい条件を決めることができる。ハイブリダイゼーションに用いる標識プローブDNA 断片の変成は、例えば、約70°C～約100°C、好ましくは約100°Cで、約1分間～約60分間、好ましくは約5分間加熱するなどして行うことができる。なお、ハイブリダイゼーションは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で行うことができるが、本明細書でストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度に関し、約15～約50mM、好ましくは約19～約40mM、より好ましくは約19～約20mMで、温度については約35～約85°C、好ましくは約50～約70°C、より好ましくは約60～約65°Cの条件を示す。

【0020】ハイブリダイゼーション完了後、フィルターなどの担体を十分に洗浄処理し、特異的なハイブリダイゼーション反応をした標識プローブDNA 断片以外の標識プローブを取り除くなどしてから検出処理をすることができる。フィルターなどの担体の洗浄処理は、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いて行うことができ、例えば、0.1 % SDS含有 0.5×SSC (0.15M NaCl、15mM クエン酸) 溶液などで洗うことにより実施できる。ハイブリダイズした核酸は、代表的にはオートラジオグラフィーにより検出することができるが、当該分野で用いられる方法の中から適宜選択して検出に用いることもできる。検出したシグナルに相当する核酸バンドを、適切な緩衝液、例えば、SM溶液(100mM NaCl および10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5) などに懸濁し、ついでこの懸濁液を適度に希釈して、所定の核酸を単離・精製、そしてさらなる増幅処理にかけることができる。ハイブリダイゼーション処理により遺伝子

12

ライブラリーやcDNAライブラリーなどを含めた核酸サンプルから目的核酸をスクリーニングする処理は、繰り返して行うことができる。

【0021】所定の核酸を保有する、ファージ粒子、組換えプラスミドなどは、当該分野で普通に使用される方法でそれを精製分離することができ、例えば、グリセロールグラジエント超遠心分離法(Molecular cloning, a laboratory manual, ed. T.Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 78, 1989)などにより精製することができる。ファージ粒子などからは、当該分野で普通に使用される方法でDNAを精製分離することができ、例えば、得られたファージなどをTM溶液(10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.8)などに懸濁し、DNase I およびRNase A などで処理後、20mM EDTA、50 μg/ml Proteinase K 及び0.5 % SDS 混合液などを加え、約65°C、約1時間保温した後、これをフェノール抽出ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させ、次に得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液(10mM EDTA 含有10mM Tris-HCl 緩衝液、pH8.0)に溶解するなどして得られる。また、目的としているDNAは、サブクローニングなどにより大量に得ることも可能であり、例えばサブクローニングは、宿主として大腸菌を用いプラスミドベクターなどを用いて行うことができる。こうしたサブクローニングにより得られたDNAも、上記と同様にして遠心分離、フェノール抽出、エタノール沈殿などの方法により精製分離できる。

【0022】本明細書において、核酸は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNA ハイブリッド、合成DNAなどの核酸であり、またヒトゲノムDNA、ヒトゲノミックDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNAのいずれであってもよい。核酸の塩基配列は、修飾(例えば、付加、除去、置換など)されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。核酸は、本発明で記載するペプチドあるいはその一部をコードするものであってよく、好ましいものとしてはDNAが挙げられる。また核酸は、対象ポリペプチド(タンパク質)、例えば各種MMP、KiSS-1/metastin、あるいはそれらの部分配列と同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチド(それと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものを含むし、それと高い相同性を有するものも含まれてよい)をコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。ヒト、チンパンジー、サル、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウサギなどの哺乳動物由来のものも包含されてもよい。該「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件で問題の配列を有するものにハイブリダイズするものであってよく、例えば当該塩基配列のうちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、

より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、当該ポリペプチドと実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。核酸は、化学合成によって得ることも可能である。その場合断片を化学合成し、それらを酵素により結合することによってもよい。

【0023】本明細書において、得られたPCR産物は、通常1~2%アガロースゲル電気泳動にかけて、特異なバンドとしてゲルから切り出し、例えば、gene clean kit (Bio 101)などの市販の抽出キットを用いてDNAを抽出する。抽出されたDNAは適当な制限酵素で切断し、必要に応じ精製処理したり、さらには必要に応じ5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼなどによりリン酸化した後、pUC18などのpUC系ベクターといった適当なプラスミドベクターにライゲーションし、適当なコンピテント細胞を形質転換する。クローニングされたPCR産物はその塩基配列を解析される。PCR産物のクローニングには、例えば、p-Direct (Clontech), pCR-Script™ SK (+) (Stratagene), pGEM-T (Promega), pAmp™ (Gibco-BRL)などの市販のプラスミドベクターを用いることが出来る。宿主細胞の形質転換をするには、例えばファージベクターを使用したり、カルシウム法、ルビジウム/カルシウム法、カルシウム/マンガン法、TFB高効率法、FSB凍結コンピテント細胞法、迅速コロニー法、エレクトロポレーションなど当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる (D. Hanahan, J. Mol. Biol., 166: 557, 1983など)。目的とするDNAを単離するためには、逆転写PCR (polymerase chain reaction coupled reverse transcription; RT-PCR)、RACE (rapid amplification of cDNA ends) を適用することが出来る。RACEは、例えば、M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols" (M. A. Froehman, "a guide to methods and applications"), pp. 28-38, Academic Press, New York (1990)などに記載された方法に従って行うことができる。

【0024】DNAは、必要に応じてクローニングでき、例えば、プラスミド、入ファージ、コスミド、P1ファージ、F因子、YACなどが利用できる。好ましくは入ファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A、Charon 21A、入gt10、入gt11、入DASHII、入FIXII、入EMBL3、入ZAPII™ (Stratagene)などが利用できる。また得られたDNAを、下記で詳しく説明するような適当なベクター、例えば、プラスミドpEX、pMAMneo、pKG5などのベクターに組込み、下記で詳しく説明するような適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母、CHO細胞、COS細胞などで発現させることができる。また、該DNA断片は、そのままあるいは適当な制御配列を付加したDNA断片として、または適当なベクターに組込み、そして動物に導入して、所定の遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作成することができる。動物としては、哺乳動

物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウシなどが挙げられる。好ましくは、マウスなどの動物の受精卵に該DNA断片を導入して、トランスジェニック動物を作成することができる。外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法(例えば、F. L. Graham et al., Virology, 52: 456, 1973など)、DEAE-デキストラン法(例えば、D. Warden et al., J. Gen. Virol., 3: 371, 1968など)、エレクトロポレーション法(例えば、E. Neumann et al., EMBO J., 1: 841, 1982など)、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうして所定の遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の產生する遺伝子産物は、それを解析することもできる。

【0025】所定の遺伝子など(本発明で得られたDNAなど)を組込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞(例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、293T細胞、CHO細胞、COS細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主)中で該DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適に修飾されたコドンが含まれていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列(ハイブリドタンパク質や融合タンパク質をコードするものも含む)等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファンプロモーター(trp)、ラクトースプロモーター(lac)、トリプトファン・ラクトースプロモーター(tac)、リポプロテインプロモーター(lpp)、入ファージ λ プロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レートプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTRプロモーター、CMVプロモーター、SR α プロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10プロモーター等を使用し得る。さらにCYC1、HIS3、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TP1、AOX1等の制御系を使用することもできる。

【0026】所望ポリペプチドをコードするDNAのトランスクリプションを促進するためエンハンサーをベクターに挿入することができ、そうしたエンハンサーとしてはプロモーターに働いてトランスクリプションを促進する作用を持つ、通常おおよそ10~100 bpのcis作用を持つエレメントのものが挙げられる。多くのエンハンサーが、グロビン、エラスター、アルブミン、 α -フェト

プロテイン、インシュリンなどの哺乳動物遺伝子から知られている。代表的には、真核細胞感染性ウイルスから得られるエンハンサーが好適に使用でき、例えばレプリケーションオリジンのレート領域にあるSV40エンハンサー(100-270 bp)、サイトメガロウイルスの初期プロモーターのエンハンサー、ポリオーマのレプリケーションオリジンのレート領域にあるエンハンサー、アデノウイルスのエンハンサーなどの例が挙げられる。また、必要に応じて、宿主にあったシグナル配列を付加することもでき、それらは当業者によく知られているものを使用できる。

【0027】大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KSTTM(Stratagene)などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、例えばpAS、pKK223(Pharmacia)、pMC1403、pMC931、pKC30、pRSET-B(Invitrogen)なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、例えばSV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、具体的にはpcD、pCD-SR α 、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5(Stratagene)などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、YIp型ベクター、YEp型ベクター、YRp型ベクター、YCp型ベクターなどが挙げられ、例えばpGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12株に由来するものが挙げられ、例えばNM533、XL1-Blue、C600、DH1、DH5、DH11S、DH12S、DH5 α 、DH10B、HB101、MC1061、JM109、STBL2、B834株由来としては、BL21(DE3)pLysSなどが挙げられる。宿主細胞が酵母の場合、例えばSaccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Pichiapastoris、Kluyveromyces株、Candida、Trichoderma reesia、その他の酵母株などが挙げられる。

【0028】宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS-7細胞、COS-1細胞、CV-1細胞、ヒト腎細胞由来293細胞、ヒト表皮細胞由来A431細胞、ヒト結腸由来205細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP細胞、MOP細胞、WOP細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO細胞、CHO DHFR $^{-}$ 細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来NIH 3T3細胞、マウスL細胞、9BHK、HL-60、U937、HaK、Jurkat細胞、その他の形質転換されて得られたセルライン、通常の二倍体細胞、インビトロの一次培養組織から誘導された細胞株などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス(Bombyxmori nuclear polyhedrosis virus)、それに由来するものあるいはその他の適切なものをベクターとし、Spodoptera frugiperda(caterpillar)、Aedes aegypti(mosquito)、Aed-

es albopictus(mosquito)、Drosophila melanogaster(fruitfly)、カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えばBM-N細胞などを用いることが挙げられる(例えば、Luckow et al., Bio/Technology, 6, 47-55(1988); Setlow, J. K. et al. (eds), Genetic Engineering, Vol. 8, pp.277-279, Plenum Publishing, 1986; Maeda et al., Nature, 315, pp.592-594(1985))。Agrobacterium tumefaciensなどを利用して、植物細胞を宿主細胞として使用することも可能であり、それに適するベクターと共に、それらは当該分野で広く知られている。本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローニングするのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることが出来る。

【0029】本発明に従い、ポリペプチドをコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、必要に応じて適当な選択マーカーを用い、繰り返しクローニングを行うことにより、高い発現能を安定して有する細胞株を得ることができる。例えば、宿主細胞として動物細胞を用いた形質転換体において、dhfr遺伝子を選択マーカーとして利用した場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅させ、より高い発現を得られる細胞株を得ることができる。本発明の形質転換体は、本発明のポリペプチドをコードする核酸が発現可能な条件下で培養し、目的物を生成、蓄積せしめることができる。該形質転換体は、当該分野で汎用されている培地中で培養することができる。例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母などを宿主としている形質転換体は、液体培地を好適に使用することができる。培地中には、該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、麦芽エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、たとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、カザミノ酸、生長促進因子などを添加してもよい。また、必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0030】培養は、例えば大腸菌では通常約15~約45℃で約3~約75時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることができる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~約20%の胎

児牛血清を含むMEM培地、PRMI1640培地、DMEM培地などが用いられる。pHは約6～約8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～約40℃で約15～約72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。所定の遺伝子産物を発現している形質転換体はそのまま利用可能であるが、その細胞ホモジネートとしても利用できるが、所定の遺伝子産物を単離して用いることもできる。上記培養細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中には尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白変性剤や、トリトンX-100（商品名）、ツウィーン-20（商品名）などの界面活性剤を加えてあってもよい。培養液中に目的生成物が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的生成物は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせてその精製を行なうことができ、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、リガンドなどを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。例えば、ゼラチニアガロース・アフィニティ・クロマトグラフィー、ヘパリンーアガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0031】さらに、本発明に係わる遺伝子の塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、所定のポリペプチドのアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したごとき変異を導入した相当するポリペプチドを製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、例えば日本生化学会編、「統生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105（広瀬進）、東京化学同人(1986)；日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III（組換えDNA技術）」、p233（広瀬進）、東京化学同人(1992)；R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350& p. 367, Academic Press, New York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983); J. A. Wells

et al., Gene, 34: 315, 1985; T. Grundstroem et al., Nucleic Acids Res., 13: 3305, 1985; J. Taylor et al., Nucleic Acids Res., 13: 8765, 1985; R. Wu et al., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987); A. R. Oliphant et al., Gene, 44: 177, 1986 などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法（部位特異的変異導入法）(Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487, 1982; Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331, 1986), カセット変異導入法 (cassette mutagenesis: Wells et al., Gene, 34: 315, 1985), 制限部位選択変異導入法 (restriction selection mutagenesis: Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415, 1986), アラン・スキャニング法 (Cunningham & Wells, Science, 244: 1081-1085, 1989), PCR変異導入法, Kunkel法, dNTP[α S]法 (Eckstein), 亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

【0032】また、遺伝子組換え法で製造する時に融合ポリペプチド（融合タンパク質）として発現させ、生体内あるいは生体外で、所望のポリペプチドと実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合ポリペプチドはその融合部を利用してアフィニティクロマトグラフィーなどで精製することも可能である。こうした融合ポリペプチドとしては、ヒスチジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal)、マルトース結合タンパク (MBP), グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、チオレドキシン (TRX) 又は Cre Recombinase のアミノ酸配列に融合せしめられたものなどが挙げられる。同様に、ポリペプチドは、ヘテロジニアスなエピトープのタグを附加され、該エピトープに特異的に結合する抗体を用いてのイムノアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製をなし得るようにすることもできる。より適した実施態様においては、ポリヒスチジン (poly-His) 又はポリヒスチジン-グリシン (poly-His-Gly) タグ、また該エピトープタグとしては、例えば AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (registered trademark, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VSV-G などが挙げられる (Field et al., Molecular and Cellular Biology, 8: pp. 2159-2165 (1988); Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: p. 3610-3616 (1985); Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6): pp. 547-553 (1990); Hopp et al., Biotechnology, 6: pp. 1204-1210 (1988); Martin et al., Science, 255: pp. 192-194 (1992); Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: pp. 15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:

pp.6393-6397 (1990) など)。酵母を利用した two-hybrid 法も利用できる。

【0033】さらに融合ポリペプチドとしては、検出可能なタンパク質となるようなマーカーを付されたものであることもできる。より好適な実施態様においては、該検出可能なマーカーは、ビオチン／ストレプトアビシン系のBiotin Avi Tag、螢光を発する物質などであってよい。該螢光を発する物質としては、オワンクラゲ (*Aequorea victorea*)などの発光クラゲ由来の緑色螢光タンパク質(green fluorescent protein: GFP)、それを改変した変異体(GFPバリエント)、例えば、EGFP (Enhanced-humanized GFP), rsGFP (red-shift GFP)、黄色螢光タンパク質(yellow fluorescent protein: YFP)、緑色螢光タンパク質(green fluorescent protein: GFP)、藍色螢光タンパク質(cyan fluorescent protein: CFP)、青色螢光タンパク質(blue fluorescent protein: BFP)、ウミシイタケ (*Renilla reniformis*)由来のGFPなどが挙げられる(宮脇敦史編、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座3—GFPとバイオイージング、羊土社(2000年))。また、上記融合タグを特異的に認識する抗体(モノクローナル抗体及びそのフラグメントを含む)を使用して検出を行うこともできる。こうした融合ポリペプチドの発現及び精製は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。得られたタンパク質(ペプチドあるいはポリペプチドを包含していてよい)は、それを酵素免疫測定法など知られた手法で、適当な担体あるいは固相に結合せしめて固相化することができる。固相化タンパク質、固相化ペプチドは、便利に結合アッセイや物質のスクリーニングに使用できる。

【0034】該ポリペプチドは、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などにすることができる。場合によっては、該ポリペプチドは、*in vivo* あるいは *in vitro* グルコシレーション又は脱グルコシレーションをしたり、グルコシリ化される位置を変えることができる(WO87/05330; Apin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp.259-306 (1981); Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: pp.52 (1987); Edge et al., Anal. Biochem., 118: pp.131 (1981); "Methods in Enzymology", Vol.138, pp. 350, Academic Press, New York (1987) 等)。該ポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基(-COOH) またはカルボキシレート (-COO-) であるが、C末端がアミド(-CONH₂ あるいは-CONHRなど) またはエステル(-COOR) であってもよい。ここでアミドやエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチ

ル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロベンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。該ポリペプチドが C末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明に従った所望ポリペプチドに含まれてよい。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。該ポリペプチドは、上記したポリペプチドにおいて、N末端にメチオニン残基を持つものであってよく、さらに該メチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁₋₅アルキルカルボニル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれてよい。

【0035】本発明の所定のペプチドは、天然に存在する形態に加えて、そのペプチドの機能と同等、又はより強力な、又はよりプラスの機能を有するペプチド類縁体のような他のポリペプチドも含む。該類縁体は、加水分解に対してより安定なもの(それ故、天然のものよりも顕著な、又は長期の効果を有し得る)又は一つ以上の潜在的なO-グリコシル化及び/又はN-グリコシル化部位を除去又は付加するように改変されたものが含まれていてよい。本発明のペプチドは、少なくとも一部分が天然でなくてもよいペプチド模擬化合物であってよい。ペプチド模擬化合物は、当該アミノ酸配列の一部を模擬した小分子であってよい。該化合物は、それを模擬するために、増加した安定性、効力、効果(potency)、生物学的利用性を有していてよい。さらに、該化合物は、減少した毒性を有していてよい。該ペプチド模擬化合物は、増大した腸粘膜透過性を有していてよい。該化合物は、合成的に調製することができる。本発明の化合物には、L-、D-、DL- 又は非天然アミノ酸、α, α-二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸が含まれていてよい。該化合物のペプチド骨格は、PSI-[CH=CH]で置換された少なくとも一つの結合を有してもよい。さらに、該化合物には、トリフルオロチロシン、p-Cl-フェニルアラニン、p-Br-フェニルアラニン、ポリ-L-プロパルギルグリシン、ポリ-D,L-アリルグリシン、あるいはポリ-L-アリ

21

ルグリシンが含まれていてよい。また、該化合物は、MMPによるKiSS-1関連産物の不活性化、MMPとKiSS-1関連産物との相互作用、さらにはそれらに起因した生物学的活性を調整するペプチド模擬化合物であり、該化合物は、適切な模擬体で置換された結合、ペプチド骨格、又はアミノ酸成分を有する。適切なアミノ酸模擬物であってよい非天然アミノ酸としては、例えば β -アラニン、L- α -アミノ酪酸、L- γ -アミノ酪酸、L- α -アミノイソ酪酸、L- ϵ -アミノカプロン酸、7-アミノヘプタン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、N- ϵ -Boc-N- α -CBZ-L-リジン、N- ϵ -Boc-N- α -Fmoc-L-リジン、L-メチオニンスルフォン、L-ノルロイシン、L-ノルバリン、N- α -Boc-N- δ -CBZ-L-オルニチン、N- δ -Boc-N- α -CBZ-L-オルニチン、Boc-p-ニトロ-L-フェニルアラニン、Boc-ヒドロキシプロリン、Boc-L-チオプロリンなどが挙げられる。

【0036】さらに、本発明では、がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものに基づいて分子設計を施して、MMPsによる各種タンパク質のプロセッシング（特には、配列番号:1のGly¹¹⁸-Leu¹¹⁹の間でのMMPの切断）を抑制あるいは阻害する活性を有するより好ましい物質を得るために使用できる。こうして得られる物質も本発明の思想の範囲内のものであるし、本発明の活性成分として扱うことができる。該配列から特定の特徴部分を選択し、(i)そのうちの薬理作用団をイソスターで置き換えることによりなされるか、(ii)構成アミノ酸残基の少なくとも1個をD体のアミノ酸残基に置き換えるか、(iii)アミノ酸残基の側鎖を修飾するか、(iv)該配列に存在するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を配置して連結するか、(v)立体構造を解析してmimic体をデザインすることなど、当該分野で採用される技術を駆使して行うことができる（例えば、首藤紘一編 医薬品の開発7巻（分子設計）、平成2年6月25日発行、株式会社廣川書店及びそこで引用している文献や論文など）。こうした技術の一部は、上記で説明したものを含んでいる。タンパク質・ポリペプチドの構造の修飾・変更などは、例えば日本生化学会編、「新生化学実験講座1、タンパク質VII、タンパク質工学」、東京化学同人(1993)を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法で行うことができる。またその生物学的活性のうちには、免疫的活性、例えば抗原性を有するということも含まれてよい。該修飾・変更のうちには、脱アミノ化、ヒドロキシル化、リン酸化、メチル化、アセチル化、開環、閉環、含有糖鎖の種類を違うものに変えること、含有糖鎖の数を増減すること、D-体アミノ酸残基への置換などであってもよい。それらの方法は、当該分野で知られている（例えば、T. E. Creighton, Proteins: Structure a

22

nd Molecular Properties, pp.79-86 W.H. Freeman & C o., San Francisco, USA (1983), 等）。

【0037】本明細書において、「実質的に同等」とはポリペプチドの活性、例えば、MMPsによる切断に対する抵抗性、MMPsによるがん転移抑制因子不活性化阻害活性、それに対応する生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含していてよく、該実質的に同質の活性としては、例えば、MMPsとがん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものとの間での複合体の形成を阻害する性質、がん転移抑制因子のMMPsによる切断を阻害する性質、配列番号:1のGly¹¹⁸-Leu¹¹⁹の間でのMMPの切断によるがん転移抑制因子不活性化に関連する細胞の移動、浸潤及び／又は転移を抑制及び／又は阻害する活性などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理学的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、該複合体形成を阻害する活性とか、がん転移抑制因子不活性化阻害活性などの活性が、同等（例えば、約0.0001～10000倍、好ましくは約0.001～1000倍、より好ましくは約0.01～200倍、さらに好ましくは約0.5～10倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なっていてもよい。

【0038】本発明のペプチドの合成には、当該ペプチド合成分野で知られた方法、例えば液相合成法、固相合成法などの化学合成法を使用することができる (Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA, USA, 1969; Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149-2154, 1963; J. Org. Chem., 37, 3404, 1972; G. B. Fields (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 289 (Solid-Phase Peptide Synthesis), Academic Press, New York (1997))。こうした方法では、例えばペプチド合成用樹脂を用い、適当に保護したアミノ酸を、それ自体公知の各種縮合方法により所望のアミノ酸配列に順次該樹脂上で結合させていく。当該ペプチド合成用樹脂樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げができる。縮合反応には、好ましくはそれ自体公知の各種活性化試薬を用いるが、こうした試薬としては、例えばジシクロヘキシリカルボジイミド(DCC)、N,N'-ジイソプロピルカル

ボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどのカルボジイミド類を好ましく使用できる。生成物が保護基を有する場合には、適宜保護基を除去することにより目的のものを得ることができる。必要に応じて分子内ジスルフィド結合形成反応を実施してもよい。溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20°C～50°Cの範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。場合により、縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。また、無水酢酸またはアセチルイミダゾールなどのアセチル化剤などを用いて未反応アミノ酸をアセチル化するなどして、後の反応に影響を与えないようにすることもできる。

【0039】原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、当該分野で知られたものを使用することができ、例えば、Z、Boc、tert-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。また原料アミノ酸のカルボキシル基の保護基も、当該分野で知られたものを使用することができ、例えば、アルキルエステル（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、tert-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分校状もしくは環状アルキルエステル）、アラルキルエステル（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル）、フェナシルエステル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド体、tert-ブトキシカルボニルヒドラジド体、トリチルヒドラジド体などが挙げられる。アミノ酸の水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いら

れる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、tert-ブチル基などである。フェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl2-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、tert-ブチルなどが挙げられる。イミダゾール基の保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。原料アミノ酸のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、p-ニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフルイミド、HOEt）とのエステル〕などが挙げられる。原料アミノ酸のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

【0040】保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ビペリジン、ビペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元などが挙げられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20°C～40°Cの温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によても除去される。原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。ポリペプチドのアミド体を得る方法としては、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のα-アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させることで達成できる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記

方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。ペプチドのエスチル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エスチルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして、所望のペプチドのエスチル体を得ることができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0041】本発明の一つの態様では、活性化合物及び活性ペプチド（本発明の活性成分）は、がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものであるが、MMPsから成る群から選ばれたものの切断に対して抵抗性が付与されているかあるいはMMPsから成る群から選ばれたものの切断部位に変異を導入したペプチド及びその誘導体から成る群から選ばれたもので、例えばKiSS-1タンパク質は配列番号:1で示されることが知られており、その構成する連続したアミノ酸配列から選択された2~145個の連続したアミノ酸配列、好ましくは2~126個、2~78個、2~50個、2~40個、2~30個、2~20個、2~10個及び2~5個から成る群から選ばれたものに相当するアミノ酸配列を有する変異ペプチド及びその誘導体又はその塩から成る群から選ばれたものを含んでいてよい。該ペプチドは、C末端がアミド化されたものであってよいし、好ましい場合もある。該ペプチドは、ペプチド模擬物、合成ペプチド、又はペプチド類縁体であり得る。該ペプチドは、天然には見出されない旋光性を有する非天然ペプチド、すなわちD-アミノ酸(D-amino acid)又は非天然型L-アミノ酸であることもできる。該アミノ酸は、ペプチドの半減期が増加するように、又はペプチドの効力が増大するように、又は生物利用度が増大するように改変された合成アミノ酸によって置換されていてよい。「ペプチド」及び「ポリペプチド」という用語は、本明細書を通じて、互換的に使用する。該ペプチドは、G蛋白質共役型レセプター hOT7T175 結合部位を模擬するのに必要なアミノ酸領域を保持したもの、配列番号:1のGly¹¹⁸-Leu¹¹⁹の間でのMMPの切断に対して抵抗性であるかあるいは該切断部位に変異を有しているものが挙げられる。本発明のペプチドは、ペプチドの機能にマイナス方向の影響を与える、ペプチド機能をプラス方向に増加させることができるように変更（例えば、ペプチドの効力を増加させる変更）を配列中に含んでいることができる。

【0042】代表的な変異KiSS-1タンパク質及びそのペプチド断片としては、配列番号:1のGly¹¹⁸を非極性（疎

水性）アミノ酸で置き換えたもの、例えばアラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどから成る群から選ばれたもので置き換えたもの、配列番号:1のGly¹¹⁸を極性（中性）アミノ酸で置き換えたもの、例えばセリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどから成る群から選ばれたもので置き換えたもの、配列番号:1のGly¹¹⁸を陽電荷をもつアミノ酸（塩基性アミノ酸）で置き換えたもの、例えばアルギニン、リジン、ヒスチジンなどから成る群から選ばれたもので置き換えたもの、配列番号:1のGly¹¹⁸を陰電荷をもつアミノ酸（酸性アミノ酸）で置き換えたもの、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などから成る群から選ばれたもので置き換えたもの、同様に配列番号:1のLeu¹¹⁹を非極性（疎水性）アミノ酸で置き換えたもの、同Leu¹¹⁹を極性（中性）アミノ酸で置き換えたもの、同Leu¹¹⁹を塩基性アミノ酸で置き換えたもの、同Leu¹¹⁹を酸性アミノ酸置き換えたものなどが挙げられる。また、L-グリシンをD-グリシンに置き換えたり、L-ロイシンをD-ロイシンに置き換えたりしたものであってもよい。代表的な変異KiSS-1タンパク質及びそのペプチド断片としては、KiSS-1(20-145)、KiSS-1(68-145)、KiSS-1(20-121)、そのアミド体：メタスチンやメタスチン(45-54)において、該Gly¹¹⁸が、ロイシンあるいはアラニンに置き換えられたものの他、バリン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システインなどに置き換えられたもの、該Leu¹¹⁹がグリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、フェニルアラニンなどに置き換えられたもの、該Gly¹¹⁸が、D-グリシンに置き換えられたり、該Leu¹¹⁹が、D-ロイシンに置き換えられたものである。

【0043】本発明のペプチドは、それが遊離型のものとして得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で塩に変換することができ、またそれらは塩として得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で遊離型のものあるいは他の塩に変換することができる。本発明のペプチドの塩としては、生理的に許容されるものあるいは医薬として許容されるものが好ましいが、これらに限定されない。こうした塩としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸との塩、例えば酢酸、ギ酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩などが挙げられる。さらに該塩としては、アンモニウム塩、例えばエチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヒドロキシエチルアミンなどの有機塩基との塩なども挙げられる。

【0044】本明細書において、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、(1) 対比される当該アミノ酸配列中の

1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2) 対比される当該アミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3) 対比される当該アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(4) それらを組み合わせたアミノ酸配列を意味する。具体的には、例えば、対比される当該アミノ酸配列として配列番号:1、KiSS-1(20-145)、KiSS-1(68-145)、KiSS-1(68-121)、KiSS-1(20-121)、KiSS-1(112-121) 又はKiSS-1(112-145)におけるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号:1またはその他の当該KiSS-1フラグメントのアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。

【0045】本発明で開示のMMPsから選ばれたものに対して抵抗性のもの（例えば、MMPによる切断に対して天然型のものに対してより安定性を持つもの）であるような変異KiSS-1タンパク質及びそのペプチド断片、さらには変異メタスチン、変異メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものなど（以下、単に「変異KiSS-1産物誘導体」という）は、癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、肺癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等）の予防または治療薬に有用である。該変異KiSS-1産物誘導体は、そのレセプター蛋白質との関係からみて、胎盤機能調節作用を有すると期待され、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬に有用である。さらに、該変異KiSS-1産物誘導体は、細胞の転移を抑制する活性を有することから、望ましくない細胞の移動・転移に起因する病的な症状、例えば炎症、アレルギーなどの予防または治療薬に

有用である。

- 【0046】本明細書中、「マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤」あるいは「MMP 阻害剤 (MMPI)」は、マトリックスメタロプロテアーゼの活性を阻害する活性を有しているもので、有用な活性を持つものであれば制限されることがなく含まれてよいが、例えば公知の様々な種類のものを包含していてよい。マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤としては、MMP ファミリーに対するインヒビター活性を有するもの、例えば天然に存在するタンパク質、例えばティッシュ インヒビター オブ マトリックスメタロプロテアーゼ類 (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: TIMPs) であってもよいし、あるいは特に合成化合物を含んでいてよく、ヒドロキサム酸、カルボン酸、ホスホン酸、チオールの誘導体などを包含していてよく、例えばTIMP-2などのほか、WO, A, 0 0/03703, WO, A, 00/03734, WO, A, 01/092507及びそこに引用した文献に開示のもの、さらには表1、表2、表3及び表4に列挙されたようなものが包含される。該メタロプロテイナーゼ阻害剤は、例えば、表1～4に記載された特許公報の実施例（なお、表では、具体的には実施例番号として示してある）に開示のものが挙げられる。表1、表2、表3及び表4に挙げられた特許公報に開示の内容は、そこに開示の特定の実施例並びに当該実施例に具体的に示された化合物を含めて、当該文献を参考することにより本明細書の開示の一部となっているものである。各種のMMP 阻害剤を開示し、代表的な癌転移抑制遺伝子KiSS-1産物 (KiSS-1, metastin, metastin (45-54)を包含する) 切断阻害MMPI化合物は、例えば国際公開第WO 97/27174号 (WO 97/27174), WO 97/20824, 英国特許公開明細書第2268934号 (GB 2268934 A, 又は米国特許明細書第5310763号 (US 5310763)), US 5268384, US 5455258, WO 96/11209, WO 97/18207, WO 97/32846, WO 98/17643, 特開平7-101925号公報, US 5614625, WO 98/30551, WO 98/43963, WO 96/15096, WO 96/33968, WO 99/31052, WO 00/69812などに開示されている。
- 【0047】
【表1】

特許公報	実施例番号
WO 92/21360	1-5
WO 94/12169	1-15
WO 97/11936	1-22
WO 96/35711	1-31
WO 96/35712	1-31
WO 96/35714	1-10
WO 96/35687	1-4
WO 97/12861	1
WO 97/12902	1-8
WO 97/19075	1-10
WO 97/37973	1-4
WO 97/37974	1-8
WO 97/38007	1-4
WO 95/19956	1-38
WO 96/06074	1-14
WO 95/12603	1-23
WO 95/19961	1-36
WO 96/16931	1-12
WO 95/33709	1-7
WO 95/33731	1-41
EP 0574758 A1	1-43
WO 95/19965	1-45

特許公報	実施例番号
WO 93/05026	1-55
WO 95/23790	1-3
WO 95/29892	1-425
WO 96/00214	1-6
WO 95/35275	1-30
WO 95/35276	1-17
WO 96/27583	1-19
WO 95/32944	1-21
WO 96/23791	1-60
WO 96/15096	1-429
WO 96/11209	1-79
EP 0719770 A1	1-15
WO 96/17838	1-8
WO 97/03783	1-22
WO 96/40204	1-12
WO 97/48685	1-6
WO 96/33166	1-94, 201-268, 301-371
WO 95/06031	1-14
WO 97/42168	1-24
WO 97/49674	1-23
WO 97/02239	1-6

3 1

特許公報	実施例番号
WO 97/19053	1-33
WO 97/18183	1-2
WO 97/19050	1-4
GB 2298423-A	1-6
WO 97/18207	1-4416
WO 96/33991	1-7
WO 97/15553	1-50
WO 97/47599	1-23
WO 96/33968	1-19
WO 96/33161	1-8
WO 96/33165	1-13
WO 97/31892	1-67
WO 97/32846	1-197
WO 96/40101	1-5
WO 97/22587	1-3
WO 96/33172	1-6
EP 757984 A1	1-3
WO 97/45402	1-10
WO 97/27174	1-267
EP 0757037 A2	1-4
EP 0780386-A1	1-35

3 2

特許公報	実施例番号
WO 97/49679	1-32
WO 97/24117	1-49
WO 97/18188	1-45
WO 97/23459	1-7
WO 96/38434	1-2
WO 97/43237	1-19
WO 97/43245	1-16
WO 97/43238	1-9
WO 96/40745	1-36
WO 90/05719	1-26
WO 97/20824	1-22
EP 0606046 A1	1-32
GB 2287023A	1-10
WO 94/22309	1-21
EP 0816341 A1	15
WO 97/40031	1-88
WO 97/48688	1-60
WO 97/43240	1-16
WO 97/43247	1-32
WO 97/43239	1-22

【0049】

* * 【表3】

特許公報	実施例番号	特許公報	実施例番号
US 5666777	1-45	WO 98/30551	1-67
GB 2321641 A	1-29	WO 98/17643	1-19
WO 98/50348	1-7	WO 98/49124	1-3
US 5789494	1-427	DE 19548624 A1	1-13
DE 19726427 A1	1-4	WO 98/58925	1-7
WO 97/38705	1-17	WO 98/11908	1-4
WO 98/23588	1-9	WO 98/47494	1-2
US 5777115	1-4	US 5780476	1-11
WO 99/07679	1-6	WO 98/38179	1-178
JP 8-506267	1-11	JP 8-104694	1-80
WO 97/18194	1-60	EP 0703239 A1	1-80
EP 0677018 A1	1-108	EP 0878467 A1	1-82
US 5698690	1-27	GB 2318789A	1-10
WO 98/08166	1-223	WO 98/08164	1-103
WO 98/39329	1-16	WO 98/14424	1-59
JP 11-35557	1-9	EP 0818442 A2	1-9
WO 98/30566	1-2	WO 98/34918	1-8
US 5854275	1-9	WO 98/38768	1-15
EP 0895988 A1	1-4	WO 98/38788	1-28
WO 98/17645	1-10	WO 98/31664	1-9
WO 99/11608	1-5	WO 98/38777	1-202
WO 97/48250	1-5	WO 97/26257	1-4
EP 0780386 A1	1-47	US 5710167	1-27
WO 98/08850	1-116	WO 98/08853	1-29
US 5639746	1-6	US 5672598	1-22
WO 99/04780	1-101	WO 98/08827	1-101
WO 98/08828	1-65	WO 98/08814	1-67
WO 97/44315	1-23	WO 98/06711	1-55
WO 98/09934	1-17	WO 98/09957	1-9
WO 97/19068	1-18	WO 98/07742	1-25
WO 98/43946	1-7		

【0050】

【表4】

特許公報	実施例番号
WO 98/30541	1-54
WO 98/43963	1-12
WO 98/22486	1-16
EP 0887339A1	1-11
WO 98/42659	1-4
WO 98/24759	1-23
WO 98/18183	1-2
WO 98/06696	1-6
US 5896147	1-21
DE 19642489 A1	1-5
EP 0877019 A1	1-172
WO 98/12211	1-7
GB 2309456 A	1-8
WO 98/39315	1-8
WO 98/42662	1-89
WO 98/03616	1-85
WO 98/34915	1-8
WO 99/07676	1-4
WO 98/18840	1-20
US 5847148	1-88
WO 97/43249	1-45
WO 98/15525	1-173
US 5731441	1-27
WO 98/08815	1-181
WO 98/08822	1-65
WO 98/08825	1-50
WO 99/06340	1-16
WO 98/09940	1-24
US 5756545	1-23
WO 98/43959	1-22

【0051】MMP 阻害剤は、がん転移抑制遺伝子KiSS-1 産物、メタスチン、メタスチン(45-54) 及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものに作用してそのペプチド結合を切断あるいは阻害する効果*

*が期待でき、がん転移抑制活性の不活性化を抑制あるいは阻止できる。したがって、がん転移抑制遺伝子KiSS-1 産物、メタスチン、メタスチン(45-54) 及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するもの有する生物活性及び／又は生理活性を安定化する。細胞の移動を抑制あるいは阻止する場合にも利用できると考えられる。かくして、(1) MMP阻害剤及び(2) (i) がん転移抑制遺伝子KiSS-1 産物、メタスチン、メタスチン(45-54) 及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものから成る群から選ばれたものとを含有している、KiSS-1 産物及びメタスチン並びにその誘導体の安定化組成物は、医薬などとして有用である。MMP 遺伝子発現細胞におけるMMPsによるKiSS-1タンパク質のプロセッシングが関連する障害、異常及び／又は疾患の予防あるいは治療に有用である。また、MMPsが関与する腫瘍細胞などの移動、浸潤、遊走及び／又は転移の制御、例えば抑制に有用であると期待される。さらに、悪性腫瘍、すなわち癌の移動、浸潤及び／又は転移の阻止及び／又は抑制するのに有用で、血管新生阻害剤、抗腫瘍剤及び／又は癌転移抑制剤として期待できる。また、血液系細胞の、MMPsによるプロセッシングに関連する障害、異常及び／又は疾患の予防あるいは治療にも有用で、消炎剤及び／又は免疫抑制剤としても期待できる。さらに、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤などとしても期待できる。

【0052】本発明の活性成分【KiSS-1遺伝子産物とMMP(例えば、MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP, MMP-2, MMP-9 など)との相互作用を阻害する物質、例えば、(a) (i) 配列番号:1の118位のグリシンと119位のロイシンとの間で

の切断に対して抵抗性をもつペプタイド、(ii)配列番号:1の118位のグリシンと119位のロイシンのいずれか一方あるいは双方において少なくとも変異を有するKiSS-1タンパク質、そのフラグメントペプチド、さらにはそれらの誘導体又はその塩等、あるいは(iii) KiSS-1変異体タンパク質又はその一部のペプチド断片などをコードするDNAなどの核酸等、(c) MMP 阻害剤、(d) KiSS-1遺伝子産物とMMPとの相互作用に関連した生物学的活性を抑制及び／又は阻害する化合物またはその塩、KiSS-1遺伝子産物の分解を制御する化合物またはその塩、(f) 本発明を使用して見出された活性物質など】は、(1) 炎症細胞の移動に起因した疾患あるいは病気の発症及び／又は進展、及び(2) 腫瘍（がんを含む）の転移、浸潤及び／又は拡散から成る群から選ばれた病的な状態あるいは症状のための医薬として期待できる。本発明の活性成分を医薬として用いる場合、例えば配列番号:1の118位のグリシンと119位のロイシンに関して少なくとも一つの変異を有するKiSS-1タンパク質関連ペプチドまたはそれらの塩、あるいはMMP 阻害剤またはそれらの塩等は、通常単独或いは薬理的に許容される各種製剤補助剤と混合して、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。好ましくは、経口投与、局所投与、または非経口投与等の使用に適した製剤調製物の形態で投与され、目的に応じていずれの投与形態（吸入法、あるいは直腸投与も含まれる）によってもよい。

【0053】また、本発明の活性成分は、抗腫瘍剤（抗がん剤）、腫瘍移転阻害剤、血栓形成阻害剤、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤、抗生物質、抗ウイルス剤、抗アレルギー剤、消炎剤及び／又は免疫抑制剤と配合して使用することもでき、それらは、有利な働きを持つものであれば制限なく使用でき、例えば当該分野で知られたものの中から選択することができる。抗腫瘍剤（抗がん剤）としては、アルキル化剤系、フルオロピリミジン系、ピリミジンヌクレオシド系、プリン系、白金アナログ系、アントラサイクリン系／アントラセンジョン系、ポドフィロトキシン系、カンプトテシン系、ホルモン及びホルモンアナログ系、ビンカアルカロイド系、タキサン系、酵素系、抗体系などに分類されるものが挙げられ、アルキル化剤系のものとしては、例えばナイトロジエンマスター-N-オキシド、サイクロホスファミド、イホスファミド、塩酸ニムスチン、ラニムスチンなど；フルオロピリミジン系のものとしては、例えば5-フルオロウラシル(5-FU)、フルオロデオキシリジン、フトラフル、カルモフル、テガフル、5'-デオキシフルオロウリジン、UFT、S-1、カペシタビンなど；ピリミジンヌクレオシド系のものとしては、例えばデオキシチジン、シタラビン、エノシタビン、サイクロシチジン、5-アザシトシン、5-アザシトシンアラビノシドなど；プリン系のものとしては、例えば6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、6-メルカプトプリンリボシド、ア

ザチオプリン、アロアリノール、クラドリビン、フルダラビン、ペントスタチン、2-クロロアデノシンなど；白金アナログ系のものとしては、例えばシスプラチン、カルボプラチン、オキザリプラチン、テトラプラチン、Pt-DACH、CI-973、JM-216など；アントラサイクリン系／アントラセンジョン系のものとしては、例えばドキソルビシン、ダウノルビシン、エビルビシン、イダルビシン、ミトキサントロンなど；ポドフィロトキシン系のものとしては、例えばエトボシド、テニボシドなど；カンプトテシン系のものとしては、例えばイリノテカン、トボテカン、9-アミノカンプトテシン、10,11-メチレンジオキシカンプトテシン、9-ニトロカンプトテシンなど；ホルモン及びホルモンアナログ系のものとしては、例えばジエチルスチルベストロール、タモキシフェン、トレミフェン、トルムデックス(Tolmudex)、チミタック(Thymitaq)、フルタミド、ビカルタミド、フィナステリド、エストラジオール、トリオキシフェン、ドロロオキシフェン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メガステロール、アミノグルテチミド、テストラクトンなど；ビンカアルカロイド系のものとしては、例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンオレルビン、ビンデシンなど；タキサン系のものとしては、例えばパクリタキセル、ドセタキセルなど；酵素、タンパク質、抗体系のものとしては、例えばアスパラギナーゼ、インターロイキン類、インターフェロン類、リュープロリドなどが挙げられ、その他、メトトレキセート、トリメトプリム、ダカルバジン、マイトイシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ペントスタチン、チオテバ、メルファランなども挙げができる。

【0054】そして、非経口的な投与形態としては、局所、経皮、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腹腔内投与を包含し得るが、患部への直接投与も可能であり、またある場合には好適もある。好ましくはヒトを含む哺乳動物に経口的に、あるいは非経口的（例、細胞内、組織内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髄腔内、点滴法、注腸、経直腸、点耳、点眼や点鼻、歯、皮膚や粘膜への塗布など）に投与することができる。具体的な製剤調製物の形態としては、溶液製剤、分散製剤、半固体製剤、粉粒体製剤、成型製剤、浸出製剤などが挙げられ、例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣を施した剤、丸剤、トローチ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、灌注剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスター剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、坐剤（例えば、直腸坐剤）、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、注射用液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品等が挙げられる。医薬用の組

成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜必要に応じて、生理学的に認められる担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、希釈剤、香味剤、香料、甘味剤、ベヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、增量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弹性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤、帯電防止剤、無痛化剤などを単独もしくは組合わせて用い、それとともに本発明のタンパク質等を混和することによって、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態にして製造することができる。

【0055】非経口的使用に適した製剤としては、活性成分と、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る媒体との無菌性溶液、または懸濁液剤など、例えば注射剤等が挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロース水溶液、その他関連した糖の溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が好ましい注射剤用液体担体として挙げられる。注射剤を調製する際は、蒸留水、リングル液、生理食塩液のような担体、適当な分散剤または湿化剤及び懸濁化剤などを使用して当該分野で知られた方法で、溶液、懸濁液、エマルジョンのごとき注射しうる形に調製する。注射用の水性液としては、例えば生理食塩液、ブドウ糖やその他の補助薬（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）を含む等張液などが挙げられ、薬学的に許容される適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノールなど）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80TM、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）又は浸透圧調節のための試薬、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、アスコルビン酸などの酸化防止剤、吸収促進剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

【0056】非経口投与には、界面活性剤及びその他の薬学的に許容される助剤を加えるか、あるいは加えずに、水、エタノール又は油のような無菌の薬学的に許容される液体中の溶液あるいは懸濁液の形態に製剤化される。製剤に使用される油性ベヒクルあるいは溶剤としては、天然あるいは合成あるいは半合成のモノあるいはジあるいはトリグリセリド類、天然、半合成あるいは合成

の油脂類あるいは脂肪酸類が挙げられ、例えばピーナッツ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油などの植物油が挙げられる。例えば、この注射剤は、通常本発明化合物を0.1～10重量%程度含有するように調製されることがある。局所的、例えば口腔、又は直腸的使用に適した製剤としては、例えば洗口剤、歯磨き剤、口腔噴霧剤、吸入剤、軟膏剤、歯科充填剤、歯科コーティング剤、歯科ペースト剤、坐剤等が挙げられる。洗口剤、その他歯科用剤としては、薬学的に許容される担体を用いて慣用の方法により調製される。口腔噴霧剤、吸入剤としては、本発明化合物自体又は薬学的に許容される不活性担体とともにエアゾール又はネブライザー用の溶液に溶解させるかあるいは、吸入用微粉末として歯などへ投与できる。軟膏剤は、通常使用される基剤、例えば、軟膏基剤（白色ワセリン、パラフィン、オリーブ油、マクロゴール400、マクロゴール軟膏など）等を添加し、慣用の方法により調製される。

【0057】歯、皮膚への局所塗布用の薬品は、適切に殺菌した水または非水賦形剤の溶液または懸濁液に調剤することができる。添加剤としては、例えば亜硫酸水素ナトリウムまたはエデト酸二ナトリウムのような緩衝剤；酢酸または硝酸フェニル水銀、塩化ベンザルコニウムまたはクロロヘキシジンのような殺菌および抗真菌剤を含む防腐剤およびヒプロメルローズのような濃厚剤が挙げられる。坐剤は、当該分野において周知の担体、好ましくは非刺激性の適当な補形剤、例えばポリエチレングリコール類、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセライド等の、好ましくは常温では固体であるが腸管の温度では液体で直腸内で融解し薬物を放出するものなどを使用して、慣用の方法により調製されるが、通常本発明化合物を0.1～95重量%程度含有するように調製される。使用する賦形剤および濃度によって薬品は、賦形剤に懸濁させるかまたは溶解させることができる。局部麻酔剤、防腐剤および緩衝剤のような補助薬は、賦形剤に溶解可能である。経口的使用に適した製剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、トローチのような固形組成物や、液剤、シロップ剤、懸濁剤のような液状組成物等が挙げられる。製剤調製する際は、当該分野で知られた製剤補助剤などを用いる。錠剤及び丸剤はさらにエンテリックコーティングされて製造されることもできる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。

【0058】本発明の活性成分は、検出可能なマーカー物質と結合したもの（例えば、¹²⁵Iで放射能ラベルされたもの、又はビオチン化されたもの）として、そのラベルされたものをその受容体を有する細胞、又は組織、及び血液、脳脊髄液、又は尿のような液体試料における検出及び定量に有用な試薬とすることも可能である。ペプチドのような物質は、投与されるとしばしば体内循環か

ら速やかに除去されるので、比較的短時間においてのみその薬理学的活性を示すこととなる。その結果、治療に有効とする状態を維持するためには、生物活性のある物質を比較的大量且つ頻繁に投与することが必要とされる。ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールの共重合体、及びポリプロピレングリコール、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、又はポリプロリンのような水溶性ポリマーを共有結合せしめてそれを修飾した物質は、対応する未修飾の物質と比べて、静脈内投与後の血中においてより長い半減期を示すことが知られている。このような修飾は、水溶液への物質の溶解度を増大させ、凝集を阻止し、物質の物理的及び化学的安定性を増大させ、物質の免疫原性及び反応性も著しく減少させる場合がある。その結果、未修飾の物質に比べてより少ない頻度で、あるいはより少ない用量で、このようなポリマー物質付加体を投与することによって、所望のインビポ生物活性を達成することができる。

【0059】ポリエチレングリコール(PEG)は、哺乳動物中で極めて毒性が低いことから、それを結合させることは特に有用である。また、PEGを結合せしめると、異種性化合物の免疫原性及び抗原性を効果的に減少せしめることができる場合がある。該化合物は、マイクロカプセル装置の中に入れて与えてよい。PEGのようなポリマーは、アミノ末端のアミノ酸の α -アミノ基、リジン側鎖の ϵ -アミノ基、アスパラギン酸又はグルタミン酸側鎖のカルボキシル基、カルボキシ末端のアミノ酸の α -カルボキシル基、又はある種のアスパラギン、セリン又はトレオニン残基に付着したグリコシル鎖の活性化された誘導体に、簡便に付着させることができる。タンパク質との直接的な反応に適した多くの活性化された形態のPEGが知られている。タンパク質のアミノ基と反応させるのに有用なPEG試薬としては、カルボン酸、カルボネート誘導体の活性エステル、特に、脱離基がN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、イミダゾール、又は1-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン-4-スルフォネットであるものが挙げられる。同様に、アミノヒドラジン又はヒドラジド基を含有するPEG試薬は、タンパク質中の過ヨウ素酸酸化によって生成したアルデヒドとの反応に有用である。さらに、本発明のDNAなどの核酸を治療及び/又は予防剤として用いる場合、該核酸はそれを単独で用いることもできるし、あるいは上記したような遺伝子組換え技術で使用される適当なベクター、例えばレトロウイルス由来ベクターなどウイルス由來のベクターなどに結合させるなどして用いることができる。本発明のDNAなどの核酸は通常の知られた方法で投与でき、そのまで、あるいは、例えば細胞内への摂取が促進されるように、適当な補助剤あるいは生理的に許容される担体などと共に、製剤化されて用いることができ、上記したような、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与

することができる。また遺伝子治療として知られた方法を適用することもできる。本発明の活性成分は、その投与量を広範囲にわたって選択して投与できるが、その投与量及び投与回数などは、処置患者の性別、年齢、体重、一般的健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。

【0060】医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十四改正 日本薬局方解説書、平成13年6月27日発行、株式会社廣川書店；一番ヶ瀬 尚他編 医薬品の開発12巻(製剤素剤〔I〕)、平成2年10月15日発行、株式会社廣川書店；同、医薬品の開発12巻(製剤素材〔II〕) 平成2年10月28日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。本発明の活性成分は、がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するもののMMPによる切断などの相互作用を抑制あるいは阻害するといった生物学的活性をもつものであれば特に限定されないが、好ましくは有利な作用を持つものが挙げられる。

キット

本発明はさらに、本発明の前述の組成物成分を1又はそれ以上を充填した1又はそれ以上の容器を含む医薬分野(臨床検査などの分析・測定分野も包含する)で許容されるパック及びキットにも関する。このような(单一あるいは複数の)容器と一緒に、医薬又は生物学的産物の30 製造、使用又は販売を規制する政府機関により指示された形態の注意書(文書)であって、ヒトへの投与用の製品の製造、使用又は販売に関する該政府機関の承認を示している注意書(添付文書)が添付されていてよいものである。

【0061】本発明に従えば、KiSS-1と各種MMPとの関係が明らかにされたので、DNA配列は、例えばKiSS-1と各種MMP及び関連タンパク質をコードする、哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA及びcDNAのスクリーニング及び両者の相関性検知のためのプローブの設計などに使用できる。該DNA配列は、例えばKiSS-1あるいは各種MMP及び関連タンパク質をコードする、哺乳動物、特に好ましくはマウス、ラットやヒトの、ゲノムDNA及びcDNAのスクリーニング及び両者の相関性検知のために広く利用できる。プローブは、必要に応じて、当該分野で広く利用されている標識を付与しておくことができる。遺伝子の単離にあたっては、PCR法、さらには逆転写酵素(RT)を用いたPCR法(RT-PCR)を利用することが出来る。例えば、KiSS-1と各種MMPの両者のmRNAのヒト組織中の発現を各種の組織由来poly(A)⁺RNAに対するノーザンプロット分析により検討することができ

41

る。所定のcDNAをプローブとして用いれば、例えばノーザン・プロティング、サザン・プロティング、in situハイブリダイゼーションなどによりヒト組織中でのKiSS-1と各種MMP のmRNAの共発現や両遺伝子自体の制御系などを検出・測定でき、ヒト組織における細胞の移動能の獲得、細胞の移動の制御、および組織マトリックスや骨の改変を含む、多くの正常な細胞のプロセスに関与する、KiSS-1と各種MMP との間の相互作用における役割、がんの浸潤・転移の様な多くの疾患等の研究の発展に貢献できる。KiSS-1と各種MMP の両者に関連した疾患の遺伝子診断にも利用できる。こうした診断は、当該タンパク質及び関連タンパク質をコードする核酸の異常、例えば損傷、突然変異、発現低下、発現過多などを診断するものであることができる。

【0062】本発明に従えば、KiSS-1と各種MMP との間の相互作用に関連する遺伝子診断法（検出方法）が提供できる。該遺伝子診断法では、(a) 核酸試料を得る工程、(b) 工程(a) にて得られた核酸試料を、例えばPCR法、RNA ポリメラーゼを利用した核酸増幅法、鎖置換増幅法などで遺伝子増幅し、例えば該KiSS-1のMMP 感受性部位などを含む領域並びに各種MMP のPRCGVPDなどを含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、及び(c) 工程(b) の核酸断片についてそれぞれ調べる工程を含む様が挙げられる。増幅の対象となる、当該部位を含む領域としては、配列番号:1のGly¹¹⁸-Leu¹¹⁹ の間などのKiSS-1のMMP 感受性部位や、各種MMP のKiSS-1産物結合部位領域遺伝子の塩基配列を含んでいる領域が挙げられるがこれには特に限定されない。上記工程(c)においては、当該分野で当業者に知られている検出方法の中から適切な方法を選んでそれを適用でき、特に限定されないが、例えばASPCR (allele-specific PCR) 法により得られたDNA 断片長を調べるなどが挙げられる。DNA 断片長を調べる方法は、特に限定されるものではないが、例えば蛍光DNA シークエンサーなどを使用して行うことができる。本工程は、変異検出法を利用することもでき、例えば制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) を検出して調べる方法なども挙げられる。また、変異の検出には、例えば変異部位を含む適当なDNA 片をプローブに用いるハイブリダイゼーション法や、SSCP法（単鎖高次構造多型）のような公知の変異検出法を使用してよい。本発明の遺伝子診断に従い、KiSS-1と各種MMP との間の相互作用に関係した遺伝子診断が可能であり、例えばがん、アレルギーなどへの罹患抵抗性・感受性決定の一素因と考えられる遺伝子及びその制御機構を含めて所定遺伝子の発現や多型などを遺伝子診断し、さらに、当該診断結果に基づき関連疾患罹病へのリスクを下げるような遺伝子治療を行うことが可能となる。

【0063】さらに、本明細書中で開示したKiSS-1と各種MMP との間の相互作用を解析するため、KiSS-1と各種

42

MMP 及びそれに関連したタンパク質、そのフラグメント、さらにはDNA を含めた核酸(mRNA やオリゴヌクレオチドを含む)は、それらを単独あるいは有機的に使用し、更には当該分野で広く知られた技術（アンチセンス法、モノクローナル抗体を含めた抗体、トランスジェニック動物など）とも適宜組合わせて、ゲノミックス及びプロテオミックス技術に応用できる。例えば、KiSS-1変異体あるいは各種MMP のうちの特定のドメイン領域などは、ドミナントネガティブ効果を利用して機能解析にも利用可能である。また、二本鎖RNA (dsRNA) を使用してのRNAi (RNA interference) 技術への応用の途もある。かくして、一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphisms)を中心とした遺伝子多型解析、核酸アレイ、タンパク質アレイを使用した遺伝子発現解析、遺伝子機能解析、タンパク質間相互作用解析、関連疾患解析、疾患治療薬解析をすることが可能となる。例えば、核酸アレイ技術では、cDNAライブラリーを使用したり、PCR 技術で得たDNA を基板上にスポットティング装置で高密度に配置して、ハイブリダイゼーションを利用して試料の解析が行われる。該アレイ化は、針あるいはピンを使用して、あるいはインクジェットプリントティング技術などでもって、スライドガラス、シリコン板、プラスチックプレートなどの基板のそれぞれ固有の位置にDNA が付着せしめられることによりそれを実施することができる。該核酸アレイ上でのハイブリダイゼーションの結果得られるシグナルを観察してデータを取得する。該シグナルは、蛍光色素などの標識（例えば、Cy3, Cy5, BODIPY, FIT C, AlexaFluor dyes (商品名), Texas red (商品名)など）より得られるものであってよい。検知にはレーザースキャナーなどを利用することもでき、得られたデータは適当なアルゴリズムに従ったプログラムを備えたコンピューターシステムで処理されてよい。また、タンパク質アレイ技術では、タグを付された組換え発現タンパク質産物を利用してよく、二次元電気泳動(2-DE)、酵素消化フラグメントを含めての質量分析(MS)（これにはエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization: ESI), マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI)などの技術が含まれ、MALDI-TOF 分析計、ESI-3 連四重極分析計、ESI-イオントラップ分析計などを使用してよい）、染色技術、同位体標識及び解析、画像処理技術などが利用されることができる。したがって、本発明には上記で得られるあるいは利用できる所定の物質に関連したソフトウェア、データベースなども含まれてよい。

【0064】当該問題の遺伝子のDNA （例えば、hOT7T175と各種MMP をコードするDNA)を対象動物に転移させるにあたっては、それをDNA 断片としてあるいは該DNA を動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合して用いるのが一般に有利である。たとえば、マウスに当該DNA を導入する場合、これと相同性が高い動物由来の当

43

該DNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、対象動物の受精卵、たとえばマウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって所定の問題としている遺伝子産物を高產生する遺伝子導入（トランスジェニック）マウスを作出できる。マウスとしては、特に純系のマウスに限定されないが、例えば、C57BL/6、Balb/C、C3H、（C57BL/6×DBA/2）F₁（BDF₁）などが挙げられる。このプロモーターとしては、例えばウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタスな発現プロモーターなどが好ましく使用しうる。また該DNAを導入する場合、組換えレトロウイルスに組み換えて、それを用いて行うこともできる。好適には対象DNAを導入されたマウス受精卵は、例えば、ICRのような仮親のマウスを使用して生育せしめることができる。受精卵細胞段階における当該DNA

（例えば、hOT7T175をコードするDNAと各種MMPをコードするDNA）の転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において当該DNA、例えば、hOT7T175や各種MMPをコードするDNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに当該遺伝子産物をコードするDNAを有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てにおいて、該遺伝子産物を発現できる可能性を有している。

【0065】当該問題の遺伝子DNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。該DNAが導入された動物は、該所定タンパク質が高発現させられているので、該所定タンパク質に関連した活性物質のスクリーニング用の動物などとして有用である。また当該遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスDNAなどのスクリーニング用の動物などとして有用である。この遺伝子導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。こうした手法で、hOT7T175遺伝子と各種MMP遺伝子とを共発現するものを得ることができる。例えば、遺伝子導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するかあるいは遺伝子により発現されたタンパク質・組織を分析することにより、KiSS-1と各種MMPとの間の相互作用に関連したタンパク質などについて分析することができる。該hOT7T175と各種MMPとの両者を产生する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、たとえば脳、胸腺、血管内皮細胞などの血管細胞、血液細胞、精巣、脳、腸、腎臓やその他の組織由来の細胞について

44

その機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、たとえば各種組織の機能を高めるような医薬開発に資することも可能である。トランスジェニックマウスなどに関連した技術は、例えば、Brinster, R. L., et al.,; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4438, 1985; Costantini, F. & Jaenisch, R. (eds): Genetic manipulation of the early mammalian embryo, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方

10 法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

【0066】当該問題の遺伝子に変異をもち、所定の遺伝子産物を全く発現しない変異マウス（ノックアウトマウス）を作出することができる。たとえば、該遺伝子の翻訳開始コドンの前後4kbを含むおよそ8kbのゲノムDNAの中央近傍に位置し翻訳開始コドンに近いエクソンにneo耐性遺伝子-polyA付加シグナルからなる遺伝子カセットを挿入した変異遺伝子を持つターゲティングベクターを構築することができる。挿入する遺伝子カセットはneo耐性遺伝子カセット以外にDT-Aカセット、tkカセット、lacZカセットなどが挙げられる。ターゲティングベクターを直鎖状に開き、樹立したマウス胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES細胞）にエレクトロポレーションで導入、さらに培養してneo耐性を獲得したES細胞を選別する。ES細胞は129、C57BL/6、F1(C57BL/6×CBA)マウスなどのマウス系統から選択して調製することができる。neo耐性を獲得したES細胞は、例えば、当該遺伝子領域において遺伝子カセットを挿入したターゲティングベクターと相同組換えを起こしていると想定され、少なくとも問題の遺伝子アレルのうち一つは破壊され、所定の遺伝子産物を正常に発現できなくなる。選別には挿入した遺伝子カセットによりそれぞれ適当な方法が選択され、また、変異の導入はPCR、ザザンハイブリダイゼーションあるいはノーザンハイブリダイゼーションなどの方法を用いて確認することができる。

【0067】変異を導入したES細胞は、C57BL/6、BALB/c、ICRマウスなどから取り出した8細胞期胚に注入、1日培養し胚盤胞に発生したものをICRのような仮親に移植することで個体まで生育させることができる。生まれる仔マウスは変異をもつES細胞と正常な宿主胚に由来するキメラマウスで、ES細胞に由来する細胞がどの程度含まれるかは個体の毛色で判断する。従って、ES細胞と宿主胚は毛色の異なる系統の組合せが望ましい。得られたキメラマウスの変異はヘテロであり、これらを適宜交配することでホモ変異マウスを得ることができる。このようにして得られたホモ変異マウスは生殖細胞および体細胞の全てにおいて、問題の遺伝子のみが破壊され、所定の遺伝子産物を全く発現せず、繁殖継代される子孫もまた同様の表現系をもつ。このノックアウトマウスは正常マウスとの比較において、発生、成長、生殖、老化および死など個体のライフサイクルにおけるKiSS-1

50

と各種MMPの相互作用の役割や各臓器、組織におけるKiSS-1と各種MMPの機能を解析するのに有用である。また、KiSS-1と各種MMPとの間の相互作用に関連した医薬品開発にも応用できる。ノックアウトマウスはこれらモデル動物としてだけではなく、組織培養のための細胞源として使用することもでき、細胞レベルでのKiSS-1と各種MMPの機能解析などに供することができる。ノックアウトマウス等に関連した技術は、例えば、Mansour, S. L., et al.,; Nature, 336: 348-352, 1988; Joyner, A. L., ed.; Gene targeting, IRL Press, 1993; 相沢慎一, ジーンターゲティングES細胞を用いた変異マウスの作成, 羊土社, 1995などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

【0068】一つの典型的な態様では、本発明の目的は、KiSS-1と各種MMPとの相互作用を効率的に検知・分析・定量したり、その相互作用に影響を与える因子・化合物などの物質を測定できる系、被検試料中のこれらの物質などを検知・分別定量する優れた方法及びその為の試薬キットを提供することにある。本発明はこうした試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記方法を用いてKiSS-1と各種MMPとの相互作用を検知・分別定量することにより、細胞の移動・転移(特にがんや炎症細胞などの移動・転移)、細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、および組織マトリックスあるいは骨の改変など、多くの正常な細胞のプロセスに関与するその相互作用の役割、アレルギー疾患、炎症性疾患、神経変性疾患およびがんの浸潤・転移の様な多くの疾患などをモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供することにある。したがって、医学的・生理学的分野における上記試薬の各種利用、KiSS-1と各種MMPとの相互作用に起因する応答・症状・疾患の研究・解析・測定、診断、予防、治療などの目的で上記試薬を使用することは、すべて本発明のその実施態様のうちに含まれると理解される。

【0069】本発明では、例えばhOT7T175と各種MMPとの両者を含有しているスクリーニング試薬(各種MMPとhOT7T175を共発現している細胞(KiSS-1を共発現しているものを含めてよい)あるいはその細胞ホモジュネートなど)を使用して、KiSS-1と各種MMPとの間の相互作用(結合を含む)により生ずる、生物学的活性などの機能(例えば、KiSS-1の不活性化、各種MMPとKiSS-1との結合を抑制あるいは阻害する活性など)を抑制又は阻害する化合物又はそれらの塩をスクリーニングすることができ、それは試薬として有用である。また、本発明では、例えばhOT7T175及び/又はKiSS-1と各種MMPとの両者を含有しているスクリーニング試薬(各種MMPとhOT7T175及び/又はKiSS-1を共発現している細胞あるいはその細胞ホモジュネートなど)を使用して、がん転移抑制因子

などをスクリーニングする方法も提供される。該スクリーニングでは、例えばhOT7T175と各種MMPとの共存下(該タンパク質を発現する形質転換体を含んでいてよい、以下同様)などに変異KiSS-1産物、変異メタスチン、変異メタスチジン(45-54)及びそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものなどの試験試料を接触させた場合と、そうでない場合との比較を行う。具体的には、上記スクリーニングでは、当該生物学的活性(例えば、KiSS-1と各種MMPとの相互作用に関連した活性など)を測定して、比較する。試験試料としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、植物抽出物、動物などの組織抽出物、細胞抽出物などが挙げられる。試験試料に使用される試験化合物の例には、好ましくは抗KiSS-1抗体、抗MMP抗体、KiSS-1産物、メタスチン及びその誘導体と各種MMPとの結合阻害剤(切断阻害剤を含む)、MMPsインヒビター活性を有する化合物、特に合成化合物などを含んでいてよい。これら化合物は、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0070】該スクリーニングは、通常の結合活性の測定法に準じて実施することができ、例えば当該分野で公知の方法などを参考にして行うことができる。また、各種標識、緩衝液系その他適切な試薬等を使用したり、そこで説明した操作等に準じて行うことができる。測定は通常トリス塩酸緩衝液、リン酸塩緩衝液などの反応に悪影響を与えないような緩衝液等の中で、例えば、pH約4～約10(好ましくは、pH約6～約8)において行うことができる。これら個々のスクリーニングにあたっては、それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明のKiSS-1と各種MMPとの間の相互作用あるいはそれと実質的に同等な活性を有する系に関連した測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、Methods in Enzymology, Academic Press社(USA)発行〕など参照〕。本発明のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを用いて得られる化合物又はその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のKiSS-1関連ペプチドと各種MMPとの間の相互作用を抑制あるいは阻害する化合物で、有利にはがん転移抑制活性を持つものである。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容される塩などが挙げられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。

【0071】明細書及び図面において、用語は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語

の意味に基づくものである。代表的な用語の意味を以下* *に示す。

タンパク質、ペプチドなどのアミノ酸配列に関しては:

A:アラニン (Ala)	M:メチオニン (Met)
C:システイン (Cys)	N:アスパラギン (Asn)
D:アスパラギン (Asp)	P:プロリン (Pro)
E:グルタミン酸 (Glu)	Q:グルタミン (Gln)
F:フェニルアラニン (Phe)	R:アルギニン (Arg)
G:グリシン (Gly)	S:セリン (Ser)
H:ヒスチジン (His)	T:スレオニン (Thr)
I:イソロイシン (Ile)	V:バリン (Val)
K:リジン (Lys)	W:トリプトファン (Trp)
L:ロイシン (Leu)	Y:チロシン (Tyr)

ヌクレオチド配列に関しては:

A:アデニン	G: グアニン
C:シトシン	T: チミン

【0072】

【実施例】以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。なお、以下の実施例において、特に指摘が無い場合には、具体的な操作並びに処理条件などは、DNA クローニングでは J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 及び D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) ; 特にPCR 法では、H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989 ; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) 及び M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols", Academic Press, New York (1990) に記載の方法に準じて行っているし、また市販の試薬あるいはキットを用いている場合はそれらに添付の指示書(protocols) や添付の薬品等を使用している。以下の実施例で使用した材料につき説明する。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は日本より入手した。プライマーはGensetにより合成し、ヒト胎盤 cDNAライブラリーはEdgeBio Systems より入手した。次に、MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-2, MMP-9 及び TIMP-2発現プラスミド、さらにMT1-MMP, MT2-MMP及びMT3-MMPに対するモノクローナル抗体は、文献: Sato, H.,

* et al., Nature, 370 (6484): 61-65 (1994); Takino, T., et al., J. Biol. Chem., 270: 23013-23020 (1995); および Tanaka M., et al., FEBS Lett., 402: 219-222 (1997) の記載に従って得られた。細胞培養に関して、FHEK293T細胞および COS-1細胞は5%ウシ胎児血清含有DMEM培地で培養した。

【0073】実施例 1

〔発現クローニング〕 J. Biol. Chem., 276, 28204-28211 (2001) 記載の方法に従って、発現クローニングを実施した。ヒト胎盤由来発現プラスミドライブラリーの発現プラスミドを、MMP-2, MMP-9およびMT1-MMP の発現プラスミドと共にヒト胎児腎臓(human embryonic kidney)由来293T細胞(HEK 293T)に導入した。発現ベクターpEAK 8 上に構築されたヒト胎盤cDNAライブラリー(EdgeBio Systems, Gaithersburg, MD) は、非増幅の大腸菌クローリングとして得た。30のバクテリアクローンを 2 ml の MMI 培地(4 mM Tris-HCl, pH 7.2, 1.25%トリプトン, 2.5%酵母抽出物, 125 mM NaCl, 0.4% グリセロール) で37°Cで一晩培養し、プラスミドDNA をアルカリSDS 法で抽出、ポリエチレンギリコールによる沈殿として精製した。これをヒト胎盤由来発現プラスミドライブラリーの発現プラスミドDNA として使用した。遺伝子導入の24時間前に、HEK 293T細胞を 5%牛胎児血清含有DMEMで、96穴 (ウエル) マイクロタイタープレート 1穴あたり 5×10^4 個/40 0.1 ml でまき込んだ。proMMP-2、proMMP-9、MT1-MMP の全長cDNAをpSG5(Stratagene)のクローニングサイトに挿入した発現ベクターを作成し、1穴あたりproMMP-2発現プラスミド20ng、proMMP-9発現プラスミド3ng、MT1-MMP 発現プラスミド30ngを、そしてヒト胎盤由来発現プラスミドライブラリーから調製したプラスミドDNA(100 ng) とともにトランスフェクション試薬TransIT LT1(Mirus, Madison, WI)を用い、その使用書に従って、導入した。遺伝子導入後37°Cで48時間培養した後、培地を除き、細胞を1穴あたり50マイクロリットルの SDS-PAGE サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl pH6.8, 10% グリ

セロール、0.1% bromophenol blue、2% SDS)中で穏やかな超音波破碎をかけ、可溶化した。細胞可溶化物はゼラチンザイモグラフィー(Kadono, Y., et al., Cancer Res., 58: 2240-2244 (1998))により分析した。その細胞可溶化物は37°Cで30分加温後、5マイクロリットルをゼラチンザイモグラフィーに供した。結果を、図1に示す。

【0074】MMP-2、MMP-9 およびMT1-MMP cDNAの遺伝子導入により、潜在型MMP-9(proMMP-9) の92kDa のバンド、潜在型MMP-2(proMMP-2) の68kDa のバンド、中間型MMP-2 、および活性型MMP-2 の64kDa のバンドを生じ、発現プラスミドライブラーから調製したプラスミドDNAの共導入により、MT1-MMPを介したMMP-2活性化を促進する遺伝子が同定された一方、プロMMP-2あるいはプロMMP-9より大きい分子量側にシフトしたところに、新しい*

```

Met Asn Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Phe Leu Cys Ala Thr
His Phe Gly Glu Pro Leu Glu Lys Val Ala Ser Val Gly Asn Ser Arg
Pro Thr Gly Gln Gln Leu Glu Ser Leu Gly Leu Leu Ala Pro Gly Glu
Gln Ser Leu Pro Cys Thr Glu Arg Lys Pro Ala Ala Thr Ala Arg Leu
Ser Arg Arg Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser
Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala
Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr
Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro
Gly Asn His Gln Arg Ser Ala Gln Arg Gly Trp Gly Ala Gln Ala Gly
Gln

```

〔配列番号:1〕

【0075】実施例2

〔組換えKiSS-1タンパク質の作成〕

```

GATCTCATCATCATCATCATCATTGAG
GATCCATGATGATGATGATGATGATGA

```

のオリゴDNAをアニールさせ作成し、FLAG-CTCプラスミド(ABI FLAG Biosystems, NY)のBgl IIサイトに挿入した。これをHis-6-CTCと称した。ヒト胎盤のトータルRNAから8 mer のランダムプライマーとReverTra Ace逆転★

```

ACCTCGAGGAGGCCATTAGAAAAGGTGGCCT
ATAGATCTGCCCCGCCAGCGCTTCTGCCG

```

をプライマーとするPCRで作成した。フォワードプライマー〔配列番号:4〕には、Xho Iサイト、リバースプライマー〔配列番号:5〕にはBgl IIサイトを付加した(下☆

```

GAGCCTCGAGGGGACCGCTCTGTCCCCGCC
ATAGATCTGCCCCGCCAGCGCTTCTGCCG

```

をプライマーとするPCRで作成した。フォワードプライマー〔配列番号:6〕には、Xho Iサイト、リバースプライマー〔配列番号:5〕にはBgl IIサイトを付加した(下◆

```

ACCTCGAGGAGGCCATTAGAAAAGGTGGCCT
CGAGATCTGAAGCGCAGGCCGAAAGGAGTTC

```

をプライマーとするPCRで作成した。フォワードプライマー〔配列番号:4〕には、Xho Iサイト、リバースプライマー〔配列番号:7〕にはBgl IIサイトを付加した(下線部)。発現したタンパク質をKiSS-1(20-121)と称した。それぞれの増幅DNA断片は、Xho IおよびBgl IIで切断

*約110 kDaのバンドが観察された(図1)。該110 kDaバンドを発生させた、プラスミドに挿入されたcDNAは、650 bpで、その配列を解析した。該cDNAは、該プラスミドを大腸菌株 XL1-Blue (Stratagene)に導入し、そして大腸菌コロニーは、2 ml MM培地で生育せしめ、プラスミドDNAを精製した。該cDNA配列は、LI-COR DNAシークエンサーMode14200L(S)-2を使用し、その塩基配列を決定した。核酸配列のホモロジー解析により、このクローンが、転写抑制遺伝子 KiSS-1 (GeneBank™ accession number NM#002256)の一部であることが明らかになった。GeneBank™ accession number NM#002256 記載のKiSS-1 アミノ酸配列を配列番号: 1 に記載した。以下、KiSS-1 タンパク質、メタスチンおよびそれぞれの変異タンパク質のアミノ酸配列番号は、配列番号:1の記載に基づく。

10

※ His-6および終止コドンをコードするDNAフラグメントは、

〔配列番号:2〕

〔配列番号:3〕

30★写酵素(TOYOBIO, Japan)を用いてcDNAを合成し、それを鋳型にし、以下のプライマーを用いて、組換えKiSS-1をコードするKiSS-1 cDNAを得た。KiSS-1のアミノ酸20位から145位をコードするKiSS-1 cDNAは

〔配列番号:4〕

〔配列番号:5〕

☆線部)。発現したタンパク質をKiSS-1(20-145)と称した。KiSS-1のアミノ酸68位から145位をコードするKiSS-1 cDNAは

〔配列番号:6〕

〔配列番号:5〕

◆線部)。発現したタンパク質をKiSS-1(68-145)と称した。KiSS-1のアミノ酸20位から121位をコードするKiSS-1 cDNAは

〔配列番号:4〕

〔配列番号:7〕

*し、His-6-CTCベクターのXho IおよびBgl IIサイトに挿入した。大腸菌株BL20は、これらのプラスミドで形質転換され、0.5 mM IPTGでタンパク質の発現が誘導された。細胞を集め、0.5% Triton X-100含有のPBS中で超音波破碎した。His-6タグタンパク質は、Ni²⁺chelating s

51

epharose (Amerhsam Pharmacia Biotech)によって、上清から精製し、TNC buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02 % NaN₃)で透析した(図2)。

【0076】実施例3

〔MMPによる組換えKiSS-1タンパク質の切断〕実施例2で作成した16 kDaの組換えKiSS-1(20-145)タンパク質をMT3-MMPとインキュベートした結果、6 kDaと10 kDaの2つの断片に開裂した。また、MT3-MMPとインキュベートした結果、14 kDaのKiSS-1(20-121)は4 kDaと10 kDaの2つの断片に開裂し、11 kDaのKiSS-1(68-145)も切断され、6 kDaの分解産物が観察された(図3)。16 kDaの組換えKiSS-1(20-145)タンパク質を種々のMMPとインキュベートした。KiSS-1(20-145)タンパク質の切断は、MT1-MMP、MT5-MMP、MMP-2およびMMP-9でも観察された(図4)。

【0077】実施例4

〔KiSS-1タンパク質切断部位の決定〕組換えKiSS-1(20-145)タンパク質(200 ng)を組換えMT3-MMP活性ドメイン(20 ng)と50 μLのTNC buffer中で37°C、3時間インキュベートし、得られた断片をPVDFメンブレンにプロットした。それぞれのN-末端アミノ酸配列は、Beckman Coulter LF300アミノ酸シーケンサーで決定した。6 kDa断片*

```
GCAGATTCTATGCACACCGTGGCTACGTCGG  
CAGATCTGAGAGGGGGCGTTGTCTCCCCCA
```

によるRT-PCRによって得た。PCR産物はプライマーに導入したEco RIとBgl II制限酵素サイト(下線部)で発現ベクターpSG5にクローン化した。HeLa細胞はGFPとhOT7T175 cDNAを共導入、48時間培養した後、100 nMのKiSS-1(12-121)と1時間反応させ、ローダミン ファロイジンで染色した。細胞は、倒立共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss, Inc.)で観察した。hOT7T175遺伝子を導入したHeLa細胞をKiSS-1(112-121)有無の条件下で処理し、細胞の運動性を低下させるアクチントレスファイバーとフォーカルアドヒージョンの発生を観察した。メタスチン処理すると、hOT7T175を発現した細胞のみでアクチントレス

```
GGAACCTCTTCGGCGGGCGCTTCGGCAAGC  
GCTTGCCGAAGCGCCGCCGAAGGAGTTCC
```

をプライマーとするPCRで作成した。增幅DNA断片は、Xba IおよびBgl IIで切断し、His-6-CTCベクターのXba IおよびBgl IIサイトに挿入した。大腸菌株BL20は、このプラスミドで形質転換され、0.5 mM IPTGでタンパク質の発現が誘導された。細胞を集め、0.5% Triton X-100含有のPBS中で超音波破碎した。His-6タグタンパク質は、Ni²⁺ chelating sepharose (Amerhsam Pharmacia Biotech)によって、上清から精製し、TNC buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02 % NaN₃)で透析した。得られた変異タンパク質をKiSS-1(68-145)G118Lと称した。実施例3と同様に11 kDaのKiSS-1(68-145)G118Lを

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Leu Leu Arg Phe

このペプチドもMT3-MMPとインキュベートしたが、分解

52

*のN-末端側の配列から、KiSS-1タンパク質は、配列番号:1の118位のグリシンと119位のロイシンとの間で切断されることが示された。KiSS-1(20-121)およびKiSS-1(68-145)の切断も同一のサイトで起こることが確認された。

【0078】実施例5

〔MMPによるKiSS-1(112-121)の切断〕メタスチンは、Gタンパク質共役型受容体(hOT7T175)のリガンドとして同定されたもので、C-末端側がアミド化したKiSS-1タンパク質の68位から121位のアミノ酸からなる。リセプターに高い親和性を持つ最も短いKiSS-1タンパク質は、10アミノ酸残基のアミド化ペプチドで、KiSS-1タンパク質の112位から121位のアミノ酸(KiSS-1(112-121))からなる。KiSS-1(112-121)ペプチドとそのMT3-MMP切断産物を、ヒドロキシアパタイトカラムC18MG(Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan)によるHPLC(Hitachi)で分析した。KiSS-1(112-121)もまた、MT3-MMP(図5)および他のMMPsでも切断された。

【0079】実施例6

〔MMPsによるKiSS-1(112-121)機能の不活性化〕メタスチンリセプター(hOT7T175)のcDNAは、ヒト胎盤cDNAライブラリーを鋳型とし、次のプライマー:

〔配列番号:8〕

〔配列番号:9〕

※レスファイバーとフォーカルアドヒージョン形成を誘導した。KiSS-1(112-121)の効果は、hOT7T175とMT1-MMPの共発現させた細胞には無効であった(図6)。また、MT3-MMPで切断したKiSS-1(112-121)は、その効果を失った。

30 【0080】実施例7

〔MMPによる変異KiSS-1タンパク質の切断〕KiSS-1(68-145)タンパク質の118位のグリシンをロイシンに置換したKiSS-1変異タンパク質をコードするcDNAは、下線の変異を導入した次なるオリゴスクレオチド配列:

〔配列番号:10〕

〔配列番号:11〕

★5)およびKiSS-1(68-145)G118LをMT3-MMPとインキュベートした。KiSS-1(68-145)からは6 kDaの分解産物が観察されたが、KiSS-1(68-145)G118Lでは分解が見られず、KiSS-1(68-145)G118Lは、MMPに対して耐性を獲得したことが示された(図7)。

【0081】実施例8

〔MMPによるメタスチンの切断〕実施例7で作成したMMP耐性KiSS-1(68-145)G118Lと同じ変異を導入したC-末端アミド化ペプチドKiSS-1(112-121)G118Lを合成した。KiSS-1(112-121)G118Lのアミノ酸配列を配列番号12に記載した。

〔配列番号:12〕

☆5☆は観察されずMMPに対して耐性を得たことが示され

た。また、118位のグリシンをアラニンに置換したC-末端アミド化ペプチドKiSS-1(112-121)G118Aを合成した。*

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Ala Leu Arg Phe [配列番号:13]

このペプチドも耐性のあるがん転移抑制剤として期待できる。

【0082】

【発明の効果】本発明により、がん転移抑制遺伝子KiSS-1産物、メタスチン、メタスチン(45-54)などの不活性化機構を解明する途が開かれ、がん転移抑制因子の活性を調整し、様々ながん転移抑制因子や薬剤に有用な物質などが提供でき、それにより癌の転移・浸潤などを含めた疾患、病気の予防・治療用の薬剤（医薬品、診断薬なども含む）が提供できる。本発明は、MMPsによるKiSS-1関連物質、特にはがん転移抑制因子の不活性化に起因する疾患の診断、該不活性化に付随する病的な状態の原因究明、診断・リスク予知などに有用である。該MMPsによ※

*KiSS-1(112-121)G118Aのアミノ酸配列を配列番号13に記載した。

※るがん転移抑制因子の切断に抵抗性の変異KiSS-1あるいは変異メタスチン並びにその誘導体ペプチドなどの活性物質を作製し、癌の浸潤及び／又は転移を含む病体病的な状態あるいは症状の予防及び／又は治療のための医薬、これを用いた測定系、生物活性調整系を開発することが可能で、がんの転移、浸潤の診断などにも有用である。本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従つてそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

【0083】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI FINE CHEMICAL CO., LTD.

<120> Stabilization of Metastasis Suppressors

<130> P-02NF383

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 145

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu Phe Leu Cys Ala Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

His Phe Gly Glu Pro Leu Glu Lys Val Ala Ser Val Gly Asn Ser Arg

20	25	30
----	----	----

Pro Thr Gly Gln Gln Leu Glu Ser Leu Gly Leu Leu Ala Pro Gly Glu

35	40	45
----	----	----

Gln Ser Leu Pro Cys Thr Glu Arg Lys Pro Ala Ala Thr Ala Arg Leu

50	55	60
----	----	----

Ser Arg Arg Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala

85	90	95
----	----	----

Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr

100	105	110
-----	-----	-----

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro

115	120	125
-----	-----	-----

Gly Asn His Gly Arg Ser Ala Gly Arg Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly

130	135	140
-----	-----	-----

Gln

55

<400> 145

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 2

gatctccatca tcatacatcat catttag

27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 3

gatccatgtat gatgtatgtat atgtatga

27

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 4

acctcgagga gccatttagaa aagggtggcct

30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 5

atagatctgc cccgcccagc gtttctggcg

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 6

gagcctcgag gggaccgcgc tgcgtccccgc

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

57

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 7

cgagatctga agcgcaggcc gaaggagttc

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 8

gcgaattcat gcacaccgtg gctacgtccg

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 9

cagatctgag agggcggttg tctccccca

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 10

ggaactctt cggcgccgc ttccggcaagc

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 11

gcttggcaa gcgccgcgc aaggagttcc

30

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
peptide resistant to MMP

59

<400> 12

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Leu Leu Arg Phe

1	5	10
---	---	----

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed peptide resistant to MMP

<400> 13

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Ala Leu Arg Phe

1	5	10
---	---	----

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト胎児腎臓由来293T細胞中に、ヒト胎盤由来発現プラスミドライブラーーからの発現プラスミドと、MMP-9、MMP-2 およびMT1-MMP の発現プラスミドとを共に導入し、得られた細胞可溶化物についてゼラチンザイモグラフィーを行った結果の電気泳動写真である。レーン2、7、16及び19で潜在型MMP-9並びに潜在型、中間型及び活性型MMP-2 のバンド以外に110 kDa の新しいゼラチン分解のバンド(←)が観察された。

【図2】PCRで作成した各種KiSS-1 cDNA をHis-6-CTCベクターに挿入し、それでもって大腸菌を形質転換せしめ、次に発現により得られたHis-6-タグタンパク質をアフィニティーコロマトグラフィーで分離した結果の電気泳動写真である。レーン1は、KiSS-1 (20-145)、レーン2は、KiSS-1 (20-121)、そしてレーン3は、KiSS-1 (68-145) の作成された組換えKiSS-1タンパク質を示している。

【図3】各種組換えKiSS-1タンパク質 (KiSS-1 (20-145), KiSS-1 (20-121) 及びKiSS-1 (68-145)) をMT3-MMPとインキュベートした結果の電気泳動写真である。16 kDaの組換えKiSS-1(20-145)タンパク質をMT3-MMPとインキュベートした結果、6 kDaと10 kDaの2つの断片に開裂した。また、14 kDaのKiSS-1(20-121)は4 kDaと10 kDaの2つの断片に開裂し、11 kDaのKiSS-1(68-145)も切断され、6kDaの分解産物が観察された。

【図4】組換えKiSS-1 (20-145) タンパク質を種々のMMPs (MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP, MMP-2及びMMP-9) と * 40

60

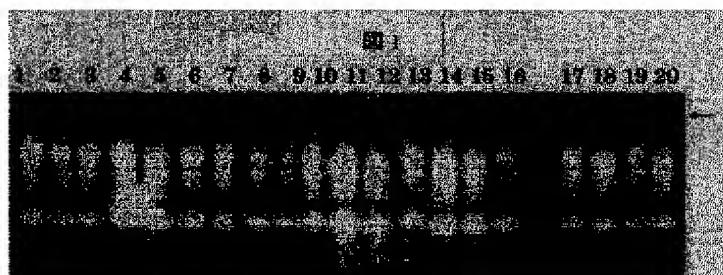
*インキュベートした結果の電気泳動写真である。KiSS-1 (20-145)タンパク質の切断は、MT3-MMP 以外のMT1-MMP、MT5-MMP、MMP-2 およびMMP-9でも観察された。

【図5】KiSS-1(112-121)ペプチドとそのMT3-MMP切断産物を、ヒドロキシアパタイトカラムC18MG(Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan)によるHPLC(Hitachi)で分析した結果を示す。KiSS-1 (112-121)は、MT3-MMP で切開されている。

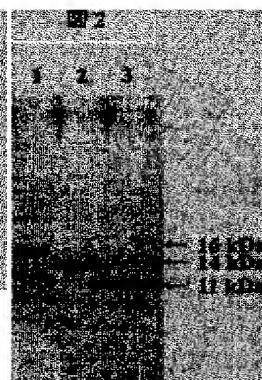
【図6】MT1-MMP及びhOT7T175遺伝子を共導入したHeLa細胞及びhOT7T175遺伝子のみを導入したHeLa細胞を、KiSS-1(112-121)有無の条件下で処理し、細胞の運動性を低下させるアクチнстレスファイバーとフォーカルアドヒージョンの発生を観察した結果を示している細胞の形態を示す写真である。細胞は、ローダミン ファロイジンで染色し、倒立共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss, Inc.)で観察した。KiSS-1(112-121)処理は、hOT7T175 30 を発現した細胞のみでアクチнстレスファイバーとフォーカルアドヒージョン形成を誘導したが、hOT7T175とMT1-MMPの共発現させた細胞には無効であった。

【図7】11 kDaの組換えKiSS-1(68-145)及び118位のグリシンをロイシンに置換した変異タンパク質KiSS-1(68-145)G118LをMT3-MMPとインキュベートした結果の電気泳動写真である。KiSS-1(68-145)からは6 kDaの分解産物が観察されたが、KiSS-1(68-145)G118L では分解が見られず、KiSS-1(68-145)G118L は、MMPに対して耐性を獲得したことが示された。

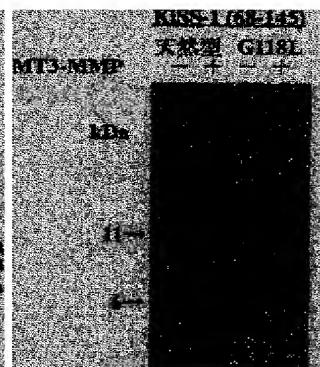
【図1】



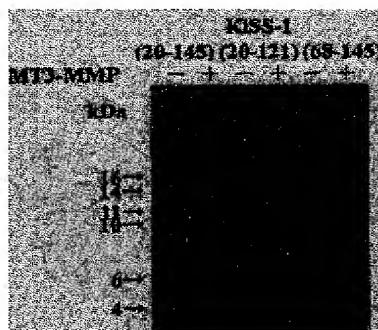
【図2】



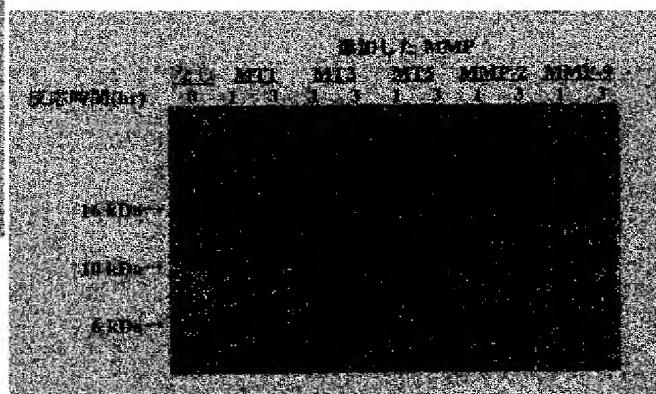
【図7】



【図3】

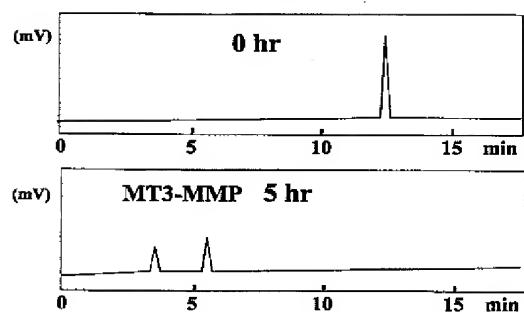


【図4】

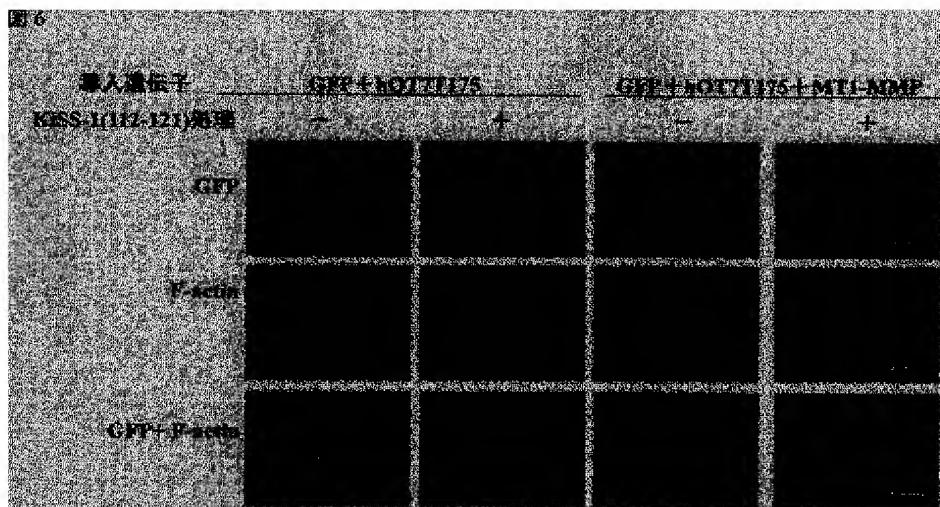


【図5】

図5



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	マークド (参考)
C 1 2 Q	1/02	G O 1 N 33/15	Z
G O 1 N	33/15	33/50	Z
	33/50	A 6 1 K 37/64	
// C 1 2 N	15/09	C 1 2 N 15/00	A

F ターム(参考) 2G045 AA40
 4B024 AA01 BA80 CA04 DA02 GA11
 4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ20 QR16
 QR48 QR51 QR77
 4C084 AA02 AA17 BA44 CA18 CA29
 DC32 NA03 NA05 NA14 ZB261
 ZB262 ZC022 ZC202
 4H045 AA10 BA10 CA46 EA28 FA72
 FA74 HA05